

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**  
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS**

**MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO DE**  
**SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER.**

**JAQUELINE MALAGUTTI CORSATO**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências,  
*Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção  
do título de Doutor em Ciências Biológicas  
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

**BOTUCATU - SP**

**- 2014 -**

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CAMPUS DE BOTUCATU**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO DE**  
**SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER.**

**JAQUELINE MALAGUTTI CORSATO**

**PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> GISELA FERREIRA**  
**ORIENTADORA**

**Tese apresentada ao Instituto de Biociências,**  
***Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção**  
**do título de Doutor em Ciências Biológicas**  
**(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal**

**BOTUCATU - SP**

**- 2014 -**



“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”

**Albert Einstein**

DEDICO,

Aos meus pais **Maria Aparecida Malagutti** e **Carlos Corsato** e minha irmã **Ana Cláudia Malagutti Corsato**, que sempre estiveram ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus**, por sempre abençoar e guiar os meus passos.

Aos meus pais, **Maria Aparecida Malagutti** e **Carlos Corsato**, pelo apoio na conclusão de mais uma etapa em minha vida.

À minha irmã **Ana Cláudia Malagutti Corsato**, pelo carinho e amizade.

Agradeço à Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **Gisela Ferreira**, pela orientação, amizade e dedicação para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Claudio Jose Barbedo**, pela colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Paulo Roberto Rodrigues Ramos**, por viabilizar e auxiliar nas análises de proteínas LEA.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> **Marília Gaspar**, por viabilizar e colaborar com as análises de açúcares solúveis no Instituto de Botânica de São Paulo.

Ao Prof. Dr. **Edivaldo Domingues Velini**, por viabilizar e colaborar com as análises hormonais realizadas no NUPAM (Núcleo de Pesquisa Aplicada à Matologia), UNESP - Botucatu.

Aos professores **João Domingos Rodrigues**, **Elisabeth Orika Onno**, **Carmen Silvia Fernandes Boaro**, do Departamento de Botânica, IB, UNESP – Botucatu, por sempre estarem dispostos à ajudar e esclarecer dúvidas que surgiram ao longo do desenvolvimento e execução do projeto.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Andréa M. T. Fortes**, que iniciou comigo esta jornada durante minha Iniciação Científica.

Ao **Instituto de Botânica de São Paulo**, por ceder sua infraestrutura para a realização das análises de açúcares solúveis.

Ao **Instituto de Biociências** da UNESP - Botucatu, por ceder sua infraestrutura para a realização desse projeto.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro concedido à realização dessa tese.

Ao **Magnun Antonio Penariol da Silva**, por todo o empenho e dedicação, se mostrando como um amigo inigualável, sempre disposto a ajudar e a colaborar com o desenvolvimento dessa pesquisa.

À **Ana Karollyna Alves de Mattos**, por toda amizade, ajuda e companheirismo ao longo da execução desse projeto.

Ao **Nilo Flávio Deplacido**, por todo carinho, atenção e cuidado que têm comigo, sempre disposto à ajudar e à compartilhar os melhores e os piores momentos desde que me conheceu.

À **Inara Regiane Moreira Coneglian**, por toda a paciência e empenho que teve na execução das análises anatômicas, sempre me auxiliando com suas conversas e experiência.

À **Jennifer Búfalo**, **Angélica Lino Rodrigues** e ao **Bruno Trevenzoli Favero**, pelas conversas amigas, ajuda nos momentos mais difíceis e também pelo companheirismo nos momentos de descontração.

Aos funcionários do Departamento de Botânica Maria Helena, José Eduardo Costa, Kleber, que sempre colaboraram quando precisei.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
<b>3. Capítulo 1: DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE <i>Annona emarginata</i> (SCHLTDL.) H. RAINER.....</b>	<b>22</b>
<b>4. Capítulo 2: SEMENTES DE <i>Annona emarginata</i> (SCHLTDL.) H. RAINER TOLERAM À DESSECAÇÃO?.....</b>	<b>48</b>
<b>5. Capítulo 3: ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES DE <i>Annona emarginata</i> (SCHLTDL.) H. RAINER.....</b>	<b>79</b>
<b>6. Capítulo 4: GERMINABILIDADE DE SEMENTES DE <i>Annona emarginata</i> (SCHLTDL.) H. RAINER APÓS DIFERENTES NÍVEIS DE SECAGEM E APLICAÇÃO DE REGULADORES VEGETAIS DURANTE O DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>111</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>146</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>147</b>
<b>7. APÊNDICE.....</b>	<b>158</b>

**CORSATO, J.M. 2014. MATURAÇÃO E AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER.** 185p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

**Resumo:** A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum-de-terra-fria) é utilizada como portaenxerto para espécies da família Annonaceae. Sugere-se que a semeadura dessa espécie seja realizada logo após a extração das sementes, indicando que essas não toleram a dessecação. O objetivo do trabalho foi estudar a maturação e a aquisição de tolerância à dessecação de sementes de *Annona emarginata* correlacionando as fases do desenvolvimento das sementes, níveis de secagem e o armazenamento com o balanço hormonal, açúcares solúveis, lipídeos, proteínas solúveis, proteínas LEA e a atividade de enzimas de estresse. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Germinação de Sementes do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências – IB, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *Campus* de Botucatu-SP. Foram realizadas cinco coletas e para cada uma delas os frutos foram analisados quanto ao tamanho, coloração, porcentagem de sólidos solúveis totais (°Brix), textura, peso, número e tamanho das sementes. As sementes provenientes desses frutos em diferentes estádios de maturação foram submetidas às análises anatômicas, determinação do teor de água inicial, curva de secagem, teste de germinação, armazenamento à baixa temperatura (-5°C) e análises bioquímicas (açúcares solúveis totais e açúcares redutores totais; proteínas totais; proteínas LEA; lipídeos totais; atividade da peroxidase; atividade da superóxido dismutase; quantificação dos teores de lipoperóxidos e quantificação hormonal). Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Observamos que sementes de *Annona emarginata* adquirem tolerância à dessecação aos 116 DAF, quando o embrião já está desenvolvido com acúmulo de sacarose, proteínas LEA além de baixa atividade de enzimas de estresse (SOD, POD e teores de lipoperóxido). Porém, estas sementes apresentam baixa longevidade, perdendo completamente a viabilidade aos 180 dias de armazenamento, independente do teor de água que apresentavam, devido à danos provocados pela baixa temperatura os quais levaram à deterioração das sementes.

**Palavras-chave:** Annonaceae, araticum-de-terra-fria, maturação e desenvolvimento das sementes, balanço hormonal, açúcares solúveis, proteínas LEA, sistemas antioxidantes.



**CORSATO, J. M. 2014. MATURATION AND TOLERANCE ACQUISITION TO DESICCATION OF SEEDS OF *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER.** 186p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

**Abstract:** The species *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum-de-terra-fria) is used as rootstock to Annonaceae family species. Suggest that the sowing of this species is carried out right after the seeds extraction, indicating that those are not tolerate to desiccation. The objective of the study was the maturation and the tolerance acquisition to desiccation of seeds of *Annona emarginata* correlating to the phases of seeds development, drying levels and storage with hormonal balance, soluble sugars, lipids, soluble proteins, LEA proteins and stress enzyme activity. The experiments were performed at the Laboratory of Physiology of Seed Germination of the Department of Botany, Institute of Biosciences - IB, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu-SP. Were performed five collections and for each one of them the fruits at different stages were analyzed for size, coloring, total soluble solids percentage (° Brix), texture, weight, number and size of seeds. The seeds from those fruits at different stages of maturation were subjected to anatomical analyzes, determination of initial water content, drying curve, germination test, storage at low temperature (-5°C) and biochemical analyzes (total soluble sugars and total reducing sugars; total proteins; LEA proteins; total lipids; peroxidase activity; superoxide dismutase activity; lipoperoxide content quantification and hormone quantification). The data were submitted to the ANOVA (F test) and the averages compared by the Tukey test at 5% probability. We observed that seeds of *Annona emarginata* acquire tolerance to desiccation at 116 DAF, when the embryo is already developed with sucrose accumulation, LEA proteins, beyond low activity of stress enzymes (SOD, POD and Lipoperoxide levels). However, these seeds have reduced longevity, completely losing viability after 180 days of storage, regardless of the water content showed that, due to the damage caused by low temperature, which led to the deterioration of seeds.

**Key words:** Annonaceae, araticum-de-terra-fria, maturation and seed development, hormonal balance, soluble sugars, LEA proteins, antioxidant systems.

## 1. INTRODUÇÃO

Com a expansão do cultivo de espécies da família Anonáceas no mundo, surge a necessidade do conhecimento dos processos fisiológicos que envolvem desde o desenvolvimento das sementes até a pós-colheita dos frutos, a fim de dar subsídios tanto a cultivos produtivos, como a programas de melhoramento genético e até orientações para escolha de espécies a serem usadas em áreas de recuperação ambiental (SÃO JOSÉ, 1997). Neste contexto, o araticum-de-terra-fria, espécie nativa do território brasileiro é de grande importância devido as suas características como portaenxerto para espécies como a atemóia, graviola e fruta-do-conde. No entanto, existem dificuldades quanto à germinação e armazenamento dessas sementes (KAVATI, 2013), o que tem sido contornado com a aplicação de reguladores vegetais para a superação da dormência e incremento no processo germinativo (FERREIRA et al., 2013).

O desenvolvimento das sementes representa um estágio crítico no ciclo de vida das plantas o qual é controlado geneticamente e pela ação hormonal (auxinas, giberelinas, citocininas e ABA), envolvendo uma sequência ordenada de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem a partir da fecundação do óvulo até o desligamento da semente madura da planta mãe (BELTRANI & PAOLI, 2003; WATERWORTH & BRAY, 2007).

Basicamente, o desenvolvimento e a maturação das sementes são divididos em três fases. A primeira, chamada de crescimento inicial, é caracterizada pelo elevado teor de água, inúmeras divisões celulares, além da histodiferenciação e morfogênese do plano básico do embrião (CASTRO et al., 2004). Após este crescimento inicial, ocorre uma fase intermediária, na qual as sementes aumentam de tamanho devido à expansão celular e deposição de reservas. Com a deposição de reservas a massa seca das sementes aumenta e as sementes iniciam a perda de água (BEWLEY et al., 2013).

Ao longo das fases iniciais do desenvolvimento, as sementes ainda não possuem completa capacidade de germinação e tolerância à dessecação (GRUWEZ et al., 2013). Por fim, na terceira fase do desenvolvimento e maturação, pode-se verificar dois tipos de comportamentos em relação à perda de água. Sementes que passam por um período pré-programado de secagem, classificadas inicialmente por Roberts (1973) como ortodoxas, que apresentam redução na quantidade de água durante a fase final do processo de maturação (WEBER et al., 2005), e sementes intolerantes à dessecação, que são dispersas com teores de água elevados e completa capacidade de germinação, sendo chamadas de recalcitrantes (WALTERS, 2000).

A redução no conteúdo de água em sementes tolerantes à dessecação, resulta em redução da atividade metabólica, o que possibilita manter a capacidade de germinação por períodos consideráveis (RAJJOU & DEBEAUJON, 2008). Assim, o conteúdo de água das sementes e a tolerância à dessecação estão relacionados com o período de armazenamento suportado pela espécie (VILLELA & PERES, 2004).

Enquanto são armazenadas, as sementes passam por um processo de deterioração, perdendo vigor, tornando-se mais sensíveis à estresse durante a germinação e conseqüentemente a longevidade da espécie é reduzida (RAJJOU & DEBEAUJON, 2008). Esse processo de envelhecimento que ocorre ao longo do armazenamento é influenciado pela genética da espécie e também pelas condições ambientais em que essas encontram-se (NAGEL & BÖNER, 2010). Assim, a manutenção da qualidade e longevidade das sementes entre o beneficiamento dos frutos até a semeadura é obtida através do emprego de técnicas adequadas, as quais procuram controlar fatores como a temperatura e umidade (ROBERTS, 1973; OLIVEIRA et al., 2006).

Considerando-se a importância da espécie, que apresenta estabelecimento de dormência e necessidade de semeadura logo após a dispersão, o que dificulta o estabelecimento de bancos de sementes bem como o manejo em viveiros, surge a necessidade da compreensão dos mecanismos envolvidos com o desenvolvimento das sementes, desde o início da floração até o armazenamento após a dispersão.

Desta forma, o objetivo do trabalho foi estudar a maturação e a aquisição de tolerância à dessecação de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer correlacionando as fases do desenvolvimento das sementes, níveis de secagem e o armazenamento com o balanço hormonal, açúcares solúveis, lipídeos, proteínas solúveis, proteínas LEA e a atividade de enzimas de estresse.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A família Annonaceae e a dormência de sementes

A família Annonaceae é representada por 140 gêneros com cerca de 2.500 espécies sendo a maioria de distribuição tropical na América, África e Ásia (PINTO et al., 2005). No Brasil, são encontrados 26 gêneros e aproximadamente 260 espécies (MAAS et al., 2006).

Para o cultivo comercial de anonáceas utiliza-se propagação clonal por enxertia e dentre as espécies utilizadas como portaenxerto destacam-se o araticum-do-brejo (*Annona glabra*), o araticum (*Annona montana*), o araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer), a *Annona coriacea*, a *Annona dioica* e a *Annona sylvatica* (SÃO JOSÉ, 1997; TOKUNAGA, 2000; KAVATI, 2013).

Apesar das espécies utilizadas como porta-enxerto serem propagadas por sementes é importante ressaltar que a família Annonaceae apresenta espécies com dormência embrionária, o que resulta em germinação lenta e desuniforme (Rizzini, 1973). Pawshe et al. (1997) e Smet et al. (1999) sugerem ainda que a germinação é afetada pela presença de ácido abscísico no embrião, impermeabilidade e resistência do tegumento, embora Ferreira et al. (2006) tenham verificado a aquisição de água pelas sementes não é impedida pelo tegumento.

Neste contexto, pesquisas têm sido desenvolvidas ao longo do tempo com o uso de reguladores vegetais com o propósito de promover a germinação de espécies usadas principalmente como porta-enxerto. Dentre os trabalhos relata-se o de Campbell & Popenoe (1968) que obtiveram 77% de germinação com uso de 350 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> em sementes de *Annona diversifolia* Saff. e o de Jubes et al. (1975) que observaram 77,32 % de germinação empregando-se 500 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> em sementes de *Annona cherimola* Mill. Outros trabalhos foram realizados com sementes de *Annona muricata* (Pinto, 1976), de *A. esquamosa* L. (PAWSHE et al., 1997; Ferreira et al., 2002; Stenzel et al., 2003), de *A. reticulata* (VALEZUELA & OSÓRIO, 1998), de *A. cherimola* Mill. (Smet et al., 1999) e de *A. crassiflora* Mart. (SILVA et al., 2007), e também de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *A. esquamosa* L.) quando o interesse é o de produzir porta-enxertos compatíveis consigo mesma, para ser usado em áreas sem histórico de patógenos no solo. Stenzel et al. (2003) observaram germinação de 67,5% empregando-se sementes da cv. ‘Gefner’, 36,25% da cv. ‘PR-1’ e 61,25% da cv. ‘PR-3’. Da mesma

forma, Oliveira (2004) e Braga (2010) também obtiveram incremento na germinação de sementes de atemóia com o uso de reguladores vegetais.

Além da dormência embrionária, há relatos de que as sementes de espécies como a *Annona crassiflora* Mart. não permitem armazenamento por longos períodos, sendo necessário que a semeadura seja realizada logo após a extração dos frutos (BERNARDES et al., 2007) o que concentra a germinação e a produção de mudas em um único período do ano, desde que as condições ambientais sejam favoráveis. Por outro lado, Carvalho et al. (2001) relatam que sementes de *Annona glabra* L. suportam redução no teor de água e congelamento, com germinação elevada após 365 dias de armazenamento.

## **2.2. *Annona emarginata* (Schltdl.) H.Rainer**

A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, sinônimo da espécie *Rollinia* sp. pertence à família Annonaceae e popularmente conhecida como araticum-de-terra-fria é nativa do território brasileiro e tem sido encontrada desde o estado do Rio Grande do Sul até Minas Gerais. A planta comporta-se bem em solos secos, tem resistência a solos úmidos e adaptação em locais situados a 950m acima do nível do mar (TOKUNAGA, 2000; RAINER, 2007).

A importância desta espécie está relacionada com sua rusticidade o que justifica seu uso em programas de melhoramento genético e como porta-enxerto para espécies da família Annonaceae. Quando utilizada como porta-enxerto para atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.) e cherimóia (*Annona cherimola* Mill.), proporciona maior compatibilidade entre enxerto e portaenxerto, vigor à copa e resistência a fungos, podridão de raízes e brocas que atacam o colo das plantas (KAVATI et al., 1997; BONAVENTURE, 1999; TOKUNAGA, 2000).

Esta espécie apresenta os frutos maduros nos meses de março e abril. Após a colheita dos frutos as sementes são extraídas, tratadas com solução fungicida e deixadas secar em local arejado. Depois da triagem das sementes estas podem ser semeadas em até seis meses (BONAVENTURE, 1999). No entanto, Tokunaga (2000) sugere que a semeadura seja feita rapidamente após a extração das sementes, devido à baixa porcentagem de germinação observada após armazenamento.

Neste contexto, Corsato et al. 2012 observou que essas sementes podem ser secas até 12% de água, porém há necessidade da aplicação de reguladores vegetais para aumentar a germinação e que a sacarose é o açúcar mais envolvido na tolerância à

dessecação. Quanto ao armazenamento, o mesmo autor concluiu que as sementes recém extraídas (teor de água 30%) devem ser armazenadas a baixas temperaturas (5°C e 15°C) por no máximo 90 dias. No entanto, a literatura não esclarece os mecanismos de tolerância à dessecação da espécie e nem o momento durante o desenvolvimento no qual a tolerância é adquirida.

### **2.3. Desenvolvimento das sementes**

O desenvolvimento das sementes representa um estágio crítico no ciclo de vida das plantas o qual é controlado geneticamente e envolve uma seqüência ordenada de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem a partir da fecundação do óvulo até o desligamento da semente madura da planta mãe (BELTRANI & PAOLI, 2003; WATERWORTH & BRAY, 2007).

Basicamente o desenvolvimento e a maturação das sementes são divididos em três fases. A primeira fase, chamada de crescimento inicial, é caracterizada pelo elevado teor de água, inúmeras divisões celulares, além da histodiferenciação e morfogênese do plano básico do embrião (CASTRO et al., 2004; GRUWEZ et al., 2013).

Após o crescimento inicial, ocorre uma fase intermediária onde as sementes aumentam de tamanho devido à expansão celular e deposição de reservas, as quais serão utilizadas durante o processo de germinação para que o embrião obtenha energia necessária para retomar seu crescimento. Com a deposição de reservas a massa seca das sementes passa a aumentar e em contrapartida as sementes iniciam a perda de água (BEWLEY & BLACK, 1994; BEWLEY et al., 2013).

Ao longo das fases iniciais do desenvolvimento, as sementes ainda não possuem completa capacidade de germinação, tolerância à dessecação, vigor e longevidade, sendo essas características adquiridas ao longo da maturação (WEBER et al; 2005). Segundo Bewley et al. (2013) o processo de maturação das sementes tem início com a deposição das reservas, sendo considerado que a semente adquire a maturidade fisiológica ao atingir o máximo de peso seco. Sabe-se que essa correlação pode ser verdadeira para algumas espécies, porém não deve ser levada como um consenso geral para determinar o ponto de maturidade fisiológica.

Samarah et al. (2010) verificaram que sementes de trigo adquirem tolerância à dessecação em estádios precoces da maturação, demonstrando que a correlação com o teor de água das sementes é um dos melhores indicadores de maturidade fisiológica para a espécie. Kundu & Sett (2011) também verificaram que a aquisição da completa

germinação em sementes de *Holoptelia integrifolia* ocorre em estádios iniciais do desenvolvimento, porém os autores explicam que este fato pode estar associado com o curto período de maturação que as sementes apresenta, sendo que o máximo de qualidade fisiológica não coincidiu com o acúmulo máximo de matéria seca.

A determinação do ponto de maturidade fisiológica das sementes é importante para o estabelecimento de programas de conservação adequados para as espécies. Assim a colheita precoce ou tardia da espécie pode induzir perda de viabilidade e envelhecimento do lote (COPELAND & MACDONALD, 1995; KUNDU & SETT, 2011).

Por fim, na terceira fase do desenvolvimento e maturação das sementes pode-se verificar dois tipos de comportamentos em relação à perda de água. Sementes que passam por um período pré-programado de secagem foram classificadas inicialmente por Roberts (1973) como ortodoxas. Estas sementes podem ser secas a níveis inferiores a 10% de água e quando reidratadas retomam seu desenvolvimento (CASTRO et al; 2004).

As sementes ortodoxas apresentam, portanto, redução na quantidade de água durante a fase final do processo de maturação, sendo que ao serem reidratadas não sofrem danos graves em seu metabolismo permitindo o armazenamento por longos períodos (CASTRO et al., 2004; MARCOS FILHO, 2005).

Em contrapartida as sementes que apresentam comportamento intolerante à dessecação não passam pela secagem pré-programada ao final de seu desenvolvimento, sendo dispersas com teores de água elevados e completa capacidade de germinação, sendo chamadas de recalcitrantes (WALTERS, 2000). Normalmente, sementes intolerantes à dessecação não apresentam dormência e podem germinar antes de serem dispersas, quando ainda estão ligadas à planta mãe, caracterizando a viviparidade (PAMENTER & BERJAK, 2000).

Além de todas as alterações fisiológicas e bioquímicas já descritas, é importante ressaltar que essas são acompanhadas de modificações anatômicas nas diferentes estruturas das sementes. Assim, o estudo da morfologia e anatomia do desenvolvimento embrionário pode auxiliar o entendimento de alterações fisiológicas e bioquímicas que ocorrem o longo desse processo (PAOLI & SARTI, 2008).

Há relatos de que em anonáceas a germinação em geral é lenta e desuniforme (RIZZINI, 1973; TOKUNAGA, 2000). Segundo Stten & Koek-Noorman (1992) e Melo (2007) a germinação lenta se deve, ao fato de que as sementes de anonáceas são

dispersas com o embrião cujo desenvolvimento ainda está incompleto, sendo considerado como embrião pequeno e pouco desenvolvido.

Não são todas as espécies de anonáceas que apresentam embrião não diferenciado quando dispersas, Hayat & Canright (1965) descreveram que o embrião de *Annona squamosa* apresenta epiderme e procâmbio diferenciados. Esquina também verificou que embriões de *A. diversifolia* também são completos no momento da dispersão. Porém o trabalho de Galastri (2008) reforça que a família apresenta embrião pouco diferenciado como demonstrado para as espécies *Dioica furfuracea*, *Annona dióica* e *Xylopia emarginata* as quais possuem embrião pequeno reto e com eixo embrionário pouco diferenciado.

Dessa forma, observa-se que as sementes de anonáceas na sua maioria quando dispersas ainda não terminaram o desenvolvimento embrionário, sendo necessário um tempo para o crescimento após a dispersão, como ocorre com espécies de algumas curcubitáceas e solanáceas (VIDIGAL et al. 2006).

Sementes de Annonaceae apresentam embriões que já estão diferenciados, porém muito pequenos se comparados com o tamanho da semente inteira e assim, necessitam de um tempo para completar seu desenvolvimento após serem desligadas da planta mãe (LINKIES et al. 2010). Este fato é conhecido como dormência morfológica e segundo Baskin & Baskin (2004) essas sementes atrasam a germinação porque ainda precisam completar seu crescimento dentro da semente.

Uma das formas de acelerar o desenvolvimento embrionário para que as sementes que apresentam dormência morfológica possam germinar ou para a superação da dormência fisiológica, é através da aplicação exógena de reguladores vegetais do grupo das giberelinas e citocininas (LINKIES et al. 2010). Estes reguladores permitem que o embrião complete seu desenvolvimento por agirem em sinergismo, promovendo o alongamento e a divisão celular, resultando em maiores valores de germinação em um menor espaço de tempo, como já foi demonstrado em vários estudos com anonáceas (STENZEL et al., 2003; FERREIRA et al., 2006; COSTA, 2009; SOCOLOWSKI & CICERO, 2011).

Este comportamento também foi observado por Yang et al. (2011) onde sementes de *Ardisia virens* quando colocadas para germinar com teor de água inicial apresentam baixa porcentagem de germinação devido a dormência que estas sementes possuem, no entanto a aplicação exógena de GA<sub>3</sub> aumentou a porcentagem e



sincronização da germinação dessas sementes, demonstrando ser um tratamento eficiente para promover o processo.

#### **2.4 Tolerância a Dessecação**

As sementes de um modo geral apresentam distintos comportamentos quanto à perda de água no final da maturação das sementes.

Sementes que passam por um período pré-programado de secagem foram classificadas primeiramente por Roberts (1973), como ortodoxas, as quais podem secar a níveis inferiores a 10% de água e provavelmente dependem dessa redução na quantidade de água dos seus tecidos para redirecionar seu metabolismo tendo como finalidade a germinação (NEDEVA & NIKOLOVA, 1997; BARBEDO et al., 2002; CASTRO et al; 2004).

Já as sementes que não passam pela secagem pré-programada no final do seu desenvolvimento, são dispersas com elevados teores de água e quando secas perdem a capacidade de germinar, Roberts (1973) classificou esse grupo de sementes como recalcitrantes. Porém, vários estudos relacionados à tolerância à dessecação foram desenvolvidos e foi verificado que este processo não é tão simples e envolve uma série de mecanismos que permitem ou não que as sementes sejam secas (HOEKSTRA et al., 1994).

Com o avanço das pesquisas nesta área, além desses dois comportamentos bem distintos, foi verificado que há um grupo de sementes que são relativamente mais tolerantes a dessecação do que as espécies recalcitrantes e menos tolerantes do que as sementes ortodoxas. Essas sementes podem ser sensíveis a refrigeração, e podem ser armazenadas em temperaturas abaixo de zero, porém por períodos mais curtos que as espécies ortodoxas (ELLIS et al., 1990; HONG et al., 1996).

Devido à complexidade envolvida na classificação das sementes quanto à tolerância à dessecação, Walters (2000) sugeriu modificação na classificação de Roberts (1973). Assim, foi proposta uma nova classificação menos estanque para as sementes que toleram e aquelas que não toleram a dessecação durante as fases finais da maturação, sugerindo o uso de níveis de tolerância à dessecação.

Cabe salientar que para que uma semente possa ser classificada quanto à tolerância a retirada de água é necessária a compreensão de diversos pré-requisitos como proteção a proteínas e enzimas, sistemas de proteção às membranas, redução do movimento de moléculas no interior celular, sistemas de proteção ao ataque de radicais

livres, redução das atividades metabólicas e reparo dessas mesmas atividades durante o processo de embebição (MARCOS FILHO, 2005).

As sementes ortodoxas ao serem dispersas normalmente apresentam teores de água inferiores a 10%, ou seja, por apresentarem potencial hídrico na faixa de -150 MPa, significa que toda a água que estava interagindo com as macromoléculas presentes nas células dos tecidos da semente foi perdida, estabelecendo um nível crítico (WALTERS, 2000).

Conhecer o teor de água das sementes torna-se importante para o desenvolvimento de estratégias eficazes visando à manutenção da viabilidade e o desenvolvimento de estratégias para a conservação e restauração de áreas degradadas (BERJAK & PAMMENTER, 2007; JOSÉ et al. 2011).

Com a perda da água, que auxilia na manutenção das estruturas celulares, ocorre a exposição de sítios macromoleculares que podem ser atacados por radicais livres e promover conseqüentemente a perda de função ou desestruturação das macromoléculas e membranas celulares (WALTERS, 2000). Dessa forma, o balanço entre geração e remoção de radicais durante a secagem e o armazenamento das sementes, relaciona-se com a longevidade das mesmas (BRANDÃO JUNIOR et al., 2002).

A perda de água pelas células pode induzir danos às membranas, alterando sua integridade funcional e estrutural. Estudos ultra-estruturais de tecidos submetidos à dessecação revelam que a membrana plasmática é o principal sítio de lesão imposto pela perda de água. Estudos com embriões de *Phaseolus vulgaris* L. demonstram que com a aquisição da tolerância à dessecação os danos nas membranas celulares são minimizados com a perda de água (LEPRINCE et al., 1993).

Outro fator que deve ser levado em consideração ao se estudar a tolerância a dessecação das sementes é a velocidade de perda de água pelas sementes durante o processo de secagem. Samarah et al. (2010) demonstraram que a secagem lenta nas sementes de trigo pode estar associada a manutenção da umidade em níveis que permite mudanças químicas associadas com a tolerância a dessecação, da mesma forma como verificado por José et al. (2011) trabalhando com sementes de *Magnolia ovata*.

Para que as células dos tecidos das sementes que toleram a retirada de água durante a fase final da maturação não sofram danos devido ao metabolismo desordenado durante a secagem o que pode inviabilizar ou impedir a ocorrência do processo de germinação, são necessários mecanismos que permitam a sobrevivência em estado

anidro (PAMMENTER & BERJAK, 2000; WALTERS, 2000; BERJAK & PAMMENTER, 2007).

Na terceira fase do desenvolvimento das sementes tolerantes a dessecação quando ocorre rápida retirada da água a nível celular, as células podem sofrer vários danos e a reativação do metabolismo pode ser comprometida durante a primeira fase do processo de germinação (embebição). No caso de sementes ortodoxas existem mecanismos que impedem que esses danos ocorram, enquanto nas sementes recalcitrantes os danos da secagem levam a perda de viabilidade das sementes (BERJAK & PAMMENTER, 2007).

Durante a fase final da maturação das sementes, o ABA é um dos responsáveis pela aquisição da tolerância à dessecação. Normalmente o conteúdo de ABA durante o início da embriogênese é baixo, atingindo níveis mais elevados na fase intermediária desse processo, sendo que entre as fases intermediárias e tardias do desenvolvimento da semente ocorre o acúmulo de RNA's mensageiros específicos em resposta à concentração do ABA (NAMBARA et al., 2010).

Andrade et al. (2009) demonstraram que o ABA se acumula no pericarpo e no eixo embrionário de sementes de girassol tolerantes a seca, no entanto esse acúmulo varia ao longo do desenvolvimento e maturação das sementes, indicando que o acúmulo desse hormônio vegetal nas sementes não depende apenas da rota de biossíntese mais também da conjugação e do catabolismo dessa substância.

Um exemplo prático da influência indireta do ácido abscísico na tolerância à dessecação foi demonstrado por Iida et al. (1992) ao tratar embriões somáticos de cenoura com ácido abscísico, o que permitiu a germinação após o processo de secagem e reidratação, entretanto quando não aplicado o regulador vegetal os embriões não resistem à dessecação.

Assim, os trabalhos demonstram cada vez mais que o ácido abscísico é o hormônio envolvido no processo de aquisição da tolerância a dessecação das sementes, com evidências de que sua ação impede a germinação ou influencia o conteúdo de carboidratos solúveis e a regulação de transcrição do gene *lea* (BRAY 1993, TETTEROO et al., 1994) o colocam como fator ligado à aquisição da tolerância à dessecação.

Os carboidratos correspondem a um dos principais tipos de reserva em sementes junto com os lipídeos e as proteínas, cujas proporções variam de espécie para espécie e também com o estágio de desenvolvimento que as sementes se encontram. Uma

porcentagem dos carboidratos presentes nas sementes corresponde aos carboidratos solúveis com destaque para a glicose, frutose, manose, galactose, sacarose e oligossacarídeos da série rafínosica. Esta fração de carboidratos solúveis pode atuar como reservas de utilização rápida ou limitando os danos causados durante a secagem de sementes maduras (BUCKERIDGE et al., 2000).

Dentre os carboidratos que demonstram a habilidade de proteger o sistema de membranas celulares da perda de água estão a sacarose, rafinose e trealose. A trealose ocorre em vários organismos tolerantes à dessecação, porém sua ocorrência em sementes de espécies angiospermas não foi observada. No caso da sacarose já foi comprovada sua capacidade de proteção em sistemas de membranas artificiais (KOSTER & LEOPOLD, 1988; HINCHA et al., 2006).

A sacarose é um açúcar abundante em sementes tolerantes à dessecação e em estudos de estresse hídrico em plantas onde seu conteúdo aumenta em resposta a dessecação dos tecidos (ILING et al., 2005). Porém, a sacarose, quando concentrada não é uma molécula estável e tende a se cristalizar. A forma de atenuar esta cristalização é a presença de oligossacarídeos da série rafínosica, os quais previnem a cristalização da sacarose fornecendo melhor proteção as células (LEPRINCE et al., 1993; KIGEL & GALILI, 1995; JOSÉ et al., 2006). Segundo Nishigawa et al. (2008) além de evitar a cristalização da sacarose os oligossacarídeos da série rafínosica junto com o galactinol atuam como compostos protetores a radicais livres, impedindo que ocorra danos oxidativos às membranas celulares.

Quando nas proporções corretas os açúcares solúveis formam nas células um estado viscoso, caracterizado como uma solução líquida, com propriedades de viscosidade de um sólido que não formam cristais de gelo mesmo em temperaturas negativas (JOSÉ et al., 2006). Por ser extremamente viscoso, este estado é capaz de atenuar os processos bioquímicos que requerem difusão molecular, atenuando a atividade de espécies reativas do metabolismo do oxigênio, auxiliando assim na estabilidade celular por muito tempo (PAMMENTER & BERJAK, 2000; ROSA, et al., 2005).

O estado viscoso é descrito pela produção de sólidos amorfos nas quais as moléculas celulares encontram-se interligadas de modo que a mobilidade passa a ser limitada no interior da matriz citoplasmática (BERJAK & PAMMENTER, 2007).

De acordo com Buitink & Leprince (2004) a identificação de cada componente citoplasmático que pode contribuir para a formação do estado viscoso é um desafio para

a compreensão da tolerância à dessecação das sementes. Hellman et al. (2008) relatam que apenas a formação do estado viscoso nas sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) não é o suficiente para manter a estabilidade celular durante o estado desidratado, sugerindo a necessidade de interações macromoleculares e metabólicas entre carboidratos, lipídeos e proteínas.

Mello et al. (2011) estudando espécies modelos demonstraram que mesmo sementes recalcitrantes como o *Ingá vera* pode acumular açúcares solúveis ao longo de um processo de secagem induzida, no entanto a quantidade e a composição desse açúcares não foram suficientes para a formação do estado vítreo que poderia contribuir para a manutenção da longevidade dessas sementes.

Em contraste sementes de *Caesalpinia echinata* e *E. speciosa* apresentaram-se mais eficientes em tolerar a perda de água, sendo considerado que a interação dos açúcares do grupo dos ciclitóis para as sementes de *Caesalpinia echinata* e rafinose e estaquiose para as sementes de *E. speciosa* seriam os açúcares potenciais para manter a estabilidade das membranas ao longo da secagem (MELLO et al., 2011).

Os açúcares que podem estar envolvidos na tolerância à dessecação de sementes ortodoxas são acumulados durante o processo de maturação das sementes e a concentração destes compostos começa a diminuir com o início da embebição, sendo que para as sementes de soja a perda da tolerância à dessecação coincide com a redução significativa de oligossacarídeos e sacarose (KOSTER & LEOPOLD, 1988).

Hoekstra et al. (1994) afirmam que durante a desidratação os açúcares solúveis, dentre eles a sacarose, pode prevenir os efeitos danosos da dessecação sobre as membranas celulares. Estes açúcares formam ligações de hidrogênio, substituindo a água associada à superfície das membranas mantendo assim o espaçamento dos grupos lipídicos, evitando a transição da fase líquida cristalina para a fase gel. Estes autores também relatam que as sementes intolerantes à dessecação apresentam esses açúcares em sua constituição, no entanto, as formas como eles se depositam durante a desidratação não garante proteção.

Pukacka & Wojkiewicz (2002) ao estimarem a tolerância à dessecação das espécies *Acer platanoides* e *Acer pseudoplatanus*, verificaram que as sementes de *Acer platanoides* são tolerantes à dessecação e que a concentração de rafinose e estaquiose aumentam significativamente durante a maturação. Para as sementes de *Acer pseudoplatanus*, foi observado que as concentrações desses carboidratos são reduzidas com a maturação e as sementes são intolerantes à secagem, estabelecendo uma relação

entre a concentração desses oligossacarídeos e o estabelecimento da tolerância a dessecação nestas espécies.

O acúmulo de sacarose também ocorre em sementes com comportamento recalcitrante como a *C. sinensis* (Berjak et al., 1989), *Q. robur* (Finch-Savage et al 1993) e *P. alba* (CONNOR & SOWA, 2003). No entanto apesar dessas sementes acumularem sacarose, elas não apresentam tolerância à secagem em ambiente natural, onde normalmente as sementes recalcitrantes perdem a viabilidade antes que ocorra a formação do estado viscoso no interior das células (BERJAK & PAMMENTER, 2007).

No caso das sementes recalcitrantes a hipótese é de que a hidrólise da sacarose forme substratos necessários para manter a atividade respiratória, sustentando o desenvolvimento contínuo dessas sementes até a germinação e estabelecimento das plântulas ao invés de auxiliarem na tolerância à dessecação (BERJAK & PAMMENTER, 2007).

Além dos carboidratos, Blackman et al. (1991), Walters et al., (2001) e Rosa et al. (2005) sugerem que a tolerância à dessecação pode estar relacionada com a produção de um grupo de proteínas denominadas LEA (Late Embryogenesis Abundant). As proteínas desse grupo são acumuladas nas últimas fases da maturação em sementes ortodoxas e desempenham papel protetor às células no estado seco, contribuindo para a tolerância à dessecação, apesar de seu modo de ação ainda não estar claro (Pammenter & Berjak, 2000).

Sabe-se que sua estrutura é altamente conservada e muito parecida com as deidrinhas, grupo de proteínas produzidas quando tecidos vegetativos sofrem secagem, sendo as deidrinhas consideradas um subgrupo das LEA (DELSENY, et al., 2001). Wise & Tunacliffe (2004) relatam que essas proteínas estão presentes em plantas e microorganismos e sua expressão gênica está relacionada com a tolerância à dessecação.

Ao serem isoladas em solução as proteínas do grupo LEA apresentam forma de bobina, no entanto ao passarem por um processo de secagem (rápido ou lento) estas proteínas assumem uma conformação alfa-helicoidal semelhante à morfologia dos filamentos intermediários do citoesqueleto, conferindo força e resistência às células vegetais além de prevenir uma plasmólise e deformação celular durante a secagem (WISE & TUNACLIFFE, 2004; BERJAK & PAMMENTER, 2007).

Blackman et al. (1991) ressaltam que esse grupo de proteínas possui a habilidade de proteger os componentes intracelulares ao longo do processo de dessecação, assim como alguns açúcares (rafinose, trealose, sacarose e outros oligossacarídeos)

encontrados nas sementes. Em trabalho com sementes de soja estes autores demonstraram que conforme ocorre o desenvolvimento dessas sementes há um acúmulo de proteínas do tipo LEA no tecido embrionário, confirmando a hipótese de que este grupo de proteínas é um dos responsáveis pela aquisição da tolerância à dessecação em sementes que apresentam comportamento ortodoxo.

Por outro lado, acredita-se que as sementes intolerantes à dessecação não apresentam ou, os mecanismos que podem garantir sobrevivência após a secagem são ineficientes (MARCOS FILHO, 2005). No entanto, as proteínas LEA têm se mostrado presentes em algumas espécies que toleram ligeira secagem e resfriamento (PAMMENTER & BERJAK, 2000).

Da Rosa et al. (2005) comprovaram que sementes de milho tolerantes a altas temperaturas de secagem apresentam maior concentração de proteínas LEA em seus tecidos, além da maior atividade da enzima alfa amilase. Porém, apenas a presença das proteínas do grupo LEA não é suficiente para garantir tolerância à dessecação, normalmente estas proteínas agem sinergicamente com a sacarose na formação do estado viscoso da matriz citoplasmática garantindo a estabilidade celular em organismos tolerantes a dessecação (BERJAK & PAMMENTER, 2007).

Neste contexto, cabe acrescentar que a presença ou ausência de proteínas do grupo LEA, não é o único fatores que pode levar a tolerância à dessecação (GEET, et al., 1994; BARBEDO & BILIA, 1998), pois Blackman et al. (1991); Bradford & Chandler (1992); Geet et al. (1994) demonstraram que mesmo sementes intolerantes à dessecação também apresentam tais proteínas sugerindo que a tolerância à dessecação corresponde a um complexo mecanismo o qual envolve um sinergismo entre várias substâncias, dentre elas proteínas, complexos enzimáticos e carboidratos (WALTERS, 2000).

Segundo Marcos Filho (2005) um dos fatores que levam algumas sementes a não tolerar dessecação seria a ausência ou ineficiência de mecanismos eficientes no combate a espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), também conhecidos como radicais livres.

A produção de espécies reativas do metabolismo do oxigênio é natural em organismos que vivem em meio aeróbico. O oxigênio em espécies eucariontes está diretamente envolvido em processos como a divisão e diferenciação celular além de funcionar como ótimo receptor de elétrons em várias reações que ocorrem nas células (HENDRY, 1993).

Hendry (1993) descreve que as ERMOS podem atacar as membranas celulares e através da peroxidação dos lipídeos a levam a deterioração das mesmas. Em sementes, este fato é evidente se levarmos em consideração que a perda da viabilidade durante a secagem e ou armazenamento é explicado em termos pela deterioração das membranas.

A peroxidação dos lipídeos tem início na presença de radicais livres (ERMOS) os quais são quimicamente instáveis e vão agir próximos a região insaturada dos ácidos graxos. A peroxidação dos ácidos graxos diminui a fluidez, pode inativar as proteínas e receptores das membranas influenciando diretamente na sua permeabilidade e conseqüente morte celular (HENDRY, 1993).

Vários danos celulares causados pela peroxidação de lipídeos durante o processo de secagem das sementes podem ser minimizados pela presença de mecanismos protetores, como a ação das enzimas glutathione redutase, superóxido dismutase, catalase e peroxidase especializadas em remover espécies reativas do metabolismo do oxigênio, também conhecidas como ERMOS (ROSA et al., 2005).

Como descrito anteriormente, mesmo com a formação do estado viscoso da matriz citoplasmática ainda pode ocorrer a formação e acúmulo de radicais livres nas células das sementes, como conseqüência do metabolismo desordenado. Estes radicais livres agem principalmente em sítios da membrana plasmática expostos pela secagem, sendo que a ausência ou a inatividade de mecanismos protetores expõe as células a lesões (MARCOS FILHO, 2005).

Bailly (2004) citado por Berjak & Pammenter (2007) demonstra que durante o desenvolvimento das sementes ocorrem grandes mudanças relacionadas à atividade das enzimas antioxidantes. Sementes de feijão (*Phaseolus vulgare* L.) quando sensíveis a dessecação apresentam elevada atividade de enzimas como a superóxido dismutase e ascórbico peroxidase, enquanto a atividade da catalase e glutathione redutase é reduzida.

Ao tornarem-se tolerantes à dessecação, foi observado que as sementes de feijão apresentam aumento na atividade das enzimas catalase e glutathione redutase ao invés da superóxido dismutase e ascórbico peroxidase, sendo este fato relacionado com a regulação dos genes para a catalase pela perda de água das células vegetais (BERJAK & PAMMENTER, 2007).

Tommasi et al. (1999) ao estudarem o sistema ascorbato em sementes ortodoxas e recalcitrantes verificaram que as sementes recalcitrantes como *Ginkgo biloba* e *Cycas revoluta* por manterem o metabolismo ativo durante a maturação das sementes é inevitável a formação de radicais livres, principalmente o peróxido de hidrogênio



durante esse processo e por esse motivo a atividade dos sistemas antioxidantes permanece elevada. Por outro lado, sementes ortodoxas ao passarem pela secagem a atividade do sistema ascorbato peroxidase decresce gradualmente sendo indetectável em sementes secas.

A enzima ascorbato redutase auxilia a catalase na eliminação do peróxido de hidrogênio formado como consequência do metabolismo desordenado durante a secagem. No caso de sementes ortodoxas de *V. flaba* a atividade dessa enzima é nula, por outro lado foi verificada atividade da enzima DHA redutase, a qual previne o embrião da ação do ácido ascórbico enquanto a atividade do sistema ascorbato redutase é nula, sendo um novo sistema produzido após 6 – 20 horas de germinação tempo também suficiente para o desaparecimento do sistema DHA redutase (TOMMASI et al., 1999).

Enquanto as sementes ortodoxas apresentam outros sistemas antioxidantes para substituir os freqüentemente encontrados antes do processo de secagem, sementes recalcitrantes não apresentam essa habilidade, sendo que a secagem lenta danifica os sistemas enzimáticos de maneira irreversível (TOMMASI et al., 1999).

Como citado anteriormente, os sistemas antioxidantes agem principalmente durante a embebição, etapa em que o metabolismo das sementes quiescentes e tolerantes a dessecação é reativado, no entanto são poucos os trabalhos que buscam investigar a presença e eficácia desses mecanismos em sementes tolerantes e intolerantes a dessecação, porém há comprovação de que eles estão presentes em sementes ortodoxas (PAMMENTER & BERJAK, 2000).

Embora a maioria das espécies recalcitrantes apresente metabolismo desordenado durante a desidratação levando a formação de radicais livres e consequentes danos oxidativos, devido a suposta ineficiência dos mecanismos antioxidativos, Greggains et al. (2000) ao estudarem a tolerância à dessecação das sementes de *Acer platanoides* e *Acer pseudoplatanoides* verificaram que apesar das sementes de *Acer pseudoplatanoides* apresentarem redução na germinação com a perda de água os mecanismos anti-oxidativos nesta espécie são funcionais e apresentam comportamento semelhante ao encontrado para as sementes de *Acer platanoides* que possui comportamento ortodoxo.

Além da presença e atividade dos mecanismos antioxidantes sementes de *Acer pseudoplatanoides* também reduzem as taxas respiratórias durante o processo de maturação, comportamento típico em sementes ortodoxas. Neste estudo os autores

verificaram que as únicas diferenças entre *Acer pseudoplatonoides* e *Acer platanoides* além do comportamento fisiológico perante a redução da perda de água, está relacionado com os teores de carboidratos e proteínas LEA, onde havia maior concentração destes compostos nas sementes de *Acer platanoides* que apresenta tolerância à dessecação (GREGGAINS et al. 2000).

## 2.5 Armazenamento das sementes

O teor de água das sementes e a tolerância à dessecação estão relacionados com o período de armazenamento suportado pela espécie. Basicamente o objetivo do armazenamento das sementes é manter a qualidade e a viabilidade das sementes durante o tempo que estas ficam armazenadas (VILLELA & PERES, 2004).

A manutenção da qualidade das sementes entre o beneficiamento dos frutos até a semeadura é obtida através do emprego de técnicas adequadas de armazenamento, as quais procuram controlar os principais fatores que afetam o armazenamento das sementes, que correspondem à temperatura e umidade (ROBERTS, 1973; OLIVEIRA et al., 2006).

Segundo Rathi et al. (2000) a técnica mais adequada para o armazenamento das sementes pode ser feita em câmara seca com temperatura baixa e atmosfera controlada, porém, algumas espécies apresentam exigências de armazenamento diferentes daquelas que empregam baixa temperatura e umidade (SCALON et al., 2004).

Para algumas espécies como *Dovyalis caffra* o ambiente de armazenamento é indiferente para a manutenção da viabilidade do lote de sementes, sendo significativo apenas o tempo em que a sementes permanecem armazenadas (OLIVEIRA et al., 2006). Diferente das sementes de *Dovyalis caffra* e sementes de uvaia (*Eugenia uvalha*) que apresentam maior porcentagem de germinação e índice de velocidade de emergência de plântulas ao serem armazenadas em geladeira (13°C) quando comparado com o armazenamento em ambiente (30°C) (SCALON et al., 2004).

Além do ambiente e o tempo que as sementes são armazenadas, o teor de água que elas se encontram também pode interferir na viabilidade do material durante o armazenamento (Rosa, 2004). Sementes armazenadas com teores de água elevados (acima de 15%) sofrem danos maiores durante o armazenamento do que aquelas que passaram por uma secagem prévia (CARVALHO, 2005).

Segundo Villela & Perez (2004) sementes que toleram secagem até níveis entre 5% e 7% de água podem ser armazenadas a baixas temperaturas, pois podem resistir a

condições de adversidades durante o período de latência sendo que ao serem expostas a condições de temperatura e umidade adequadas retomam seu desenvolvimento e completam o processo de germinação.

Durante o armazenamento das sementes ocorrem alterações que resultam na deterioração das sementes, como o esgotamento das reservas destinadas a fornecer energia para o crescimento do embrião (VILLELA & PERES, 2004). Este fato foi observado por Veiga et al. (2007) em trabalhos com sementes de café (*Coffea arabica* L.), que foi possível observar maior atividade da enzima endo beta mananase durante o armazenamento dessas sementes.

A enzima endo beta mananase está relacionada com a degradação de reservas de parede celular para o fornecimento de energia durante a germinação das sementes de cafeeiro. Dessa forma, com a elevada atividade de enzimas relacionadas com a mobilização de substâncias pode levar ao esgotamento das reservas das sementes e conseqüente perda do material vegetal (VEIGA et al., 2007; VERTUCI & ROOS, 1993).

Sabe-se que as sementes de espécies da família Annonaceae apresentam dificuldades para germinar devido a imaturidade do embrião. No entanto, Bernardes et al. (2007) verificaram que o armazenamento das sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) em sacos de papel, reduz significativamente a porcentagem de germinação dessas sementes, sendo este parâmetro quase nulo após um ano de armazenamento.

Segundo Machado & Parente (1986) as sementes de anonáceas devem permanecer em meio úmido após a extração dos frutos, caso contrário a viabilidade das sementes pode ser reduzida, influenciando na porcentagem final de germinação.

A taxa de atividade celular durante o armazenamento das sementes varia em função do teor de água, pois a energia livre da água descreve a tendência para que uma reação química ocorra em determinada temperatura (VERTUCI & ROOS, 1993).

Sementes que toleram a secagem, seja ela natural o artificial, podem ser armazenadas por longos períodos sem maiores problemas de perda de viabilidade, no entanto, aquelas que não suportam a retirada de água de suas células, requerem alternativas de armazenamento para a manutenção da viabilidade (HONG & ELLIS, 2003).

O tipo de embalagem escolhida para o armazenamento das sementes é um dos fatores que pode influenciar a viabilidade do material vegetal. As embalagens podem ser abertas ou fechadas, permeáveis, semipermeáveis e impermeáveis (ROSA, 2004).

No caso do armazenamento de sementes sensíveis à dessecação é comum a utilização de embalagens que evitem as trocas gasosas entre as sementes e o meio em que estas estão armazenadas. Porém, mesmo com a redução das trocas gasosas, outros problemas como o aumento da proliferação de microorganismos, podem surgir durante o armazenamento do material (HONG & ELLIS, 2003).

### 3. REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. p. 151-182.

ANDRADE, A., VIGLIOCCO, A., ALEMANO, S., ALIAREZ, D., ABDALA, G. Differential accumulation of abscisic acid and its catabolites in drought-sensitive and drought-tolerant sunflower seeds. **Seed Science Research**, v.19, p.201-211, 2009

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUATEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **C. R. Biologies**, v.331, p.806–814, 2008.

BAILY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, p. 93-107, 2004.

BAJGUZ, A.; PIOTROWSKA, A. Conjugates of auxin and cytokinin. **Phytochem.**, v.70, p.957–969, 2009.

BARBEDO, C.J.; CENTENO, D. da. C.; RIBEIRO, R. de. C.L.F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, v.40, n.4, p.583-593, 2013.

BARBEDO, C.J.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da mata atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 431-439, dez. 2002.

BARBEDO, C.J.; BILIA, D. A. C. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 55, n. especial, p. 121-125, 1998.

BASKIN, J.M.; BASKIN, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.*, 14: 1-16.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. **Annals of Botany**. p. 1-16, 2007.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Desiccation sensitivity of excised embryonic axes of selected amaryllid species. **Seed Science Research** (2008) 18, 1–11

BERNARDES, T.G.; ESTRÊLA, C.T.; NAVES, R.V.; REZENDE, C.F.A.; MESQUITA, M.A.M.; PIRES, L. L. Efeito do armazenamento e de fitohormônios na qualidade fisiológica de sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p. 163-168, set. 2007.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. (1994). Seeds: physiology of development and germination. 2<sup>nd</sup> ed. Plenum Press, New York.

BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation Proteins and Sugars in Desiccation Tolerance of Developing Soybean Seeds. **Plant Physiology**, v.100, p.225-230, 1992.

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, v. 96, p. 868-874, 1991.

BONAVENTURE, L. El cultivo de la chirimoya e de su híbrido atemoya em Brasil. In: **First International Symposium on Cherimoya**, Equador, 1999.

Bonjovani, M.R. & Barbedo, C.J. 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. toleram temperatura sub-zero. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 345-356.

BRANDÃO JUNIOR, D. da S.; VIEIRA, M. das G.G.C.; GUIMARÃES, R.M.; HILHORST, H.W.M. Tolerância a dessecação de sementes de café *Coffea arabica* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v.24, n.2, p. 17-23, 2002.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3 ed. New York: Springer, 2013. 392p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, J.F. et al. Germination of atemoya (*Annona cherimolla* Mill. X *A. squamosa* L.) CV. Gefner seeds subject to treatments with plant growth regulators. **International Journal of Science and Nature**, v.1, n.2, p. 120-126, 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regra de Análise de Sementes**. Brasília: departamento de produção vegetal, 2009, 398p.  
CARVALHO, N.M. **A secagem de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 2005, 165p.

BUCKERIDGE, S., M.; TINÉ, M. A. S.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes, estrutura, metabolismo, função e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 137-162, jul., 2000.

BUITINK, J., LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **C. R. Biologies**, v.331, p.788–795, 2008.

BUITINK, J., LEPRINCE, O. Glass formation in plant anhydrobiotes: Survival in the dry state. **Cryobiol.**, v.48, p.215-228, 2004.

CAMPBELL, C.W.; POPENOE, J. Effect of gibberellic acid on seed dormancy of *Annona diversifolia* saff. **Tropical Region America sociedade Horticultural Service**, v.11, p. 31-36, 1968.

CARVALHO, J.E.U de; NASCIMENTO, W.M.O do; MULLER, C.H. Tolerância de sementes de araticum-do-brejo (*Annona glabra* L.) ao dessecamento e ao congelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.23, n.1, p.179-182, 2001.

CARVALHO, N.M. **A secagem de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 2005, 165p.

CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, editora Artmed, 2004.

CONNOR, K.F.; SOWA, S. Effects of desiccation on the physiology and biochemistry of *Quercus alba* acorns. **Tree Physiology**, v.23, n.16, p.1147-1152, 2003.

COPELAND, L.O.; McDONALD, M. **Principles of seeds science and technology**. New York: Chapman Hall, 1995. 409p.

CORSATO, J.M. 2010. **TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE ARATICUM-DE-TERRA-FRIA (*Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER)**. 92p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; LEITE, H.G.; PEREIRA, B.L.C.; GONÇALVES, J.F.C. Estudo enzimático de deterioração de sementes de *melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.083-091, 2010.

COSTA, P.N. **Reguladores vegetais, luz e temperatura na germinação de sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer)**. 2009. 78p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

COSTA, P.N.; BUENO, S.S.C.; FERREIRA, G. Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura** (Impresso), v. 33, p. 253-260, 2011.

CORSATO, J.M.; FERREIRA, G.; BARBEDO, C.J. Desiccation tolerance in seeds of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer and action of plant growth regulators on germination. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.4, n.24, p.253-260, 2012.

DANTAS, B.F., SOARES, F.S.de S. LÚCIO, A.A., ARAGÃO, C.A. Alterações bioquímicas durante a embebição de sementes de baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.) **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.2, p.214-219, 2008.

DELSENY, M.; BIES-ETHEVE, N.; CARLES, C.; VICIENT, C.; RAYNAL, M.; GRELLET, F.; ASPART, L. Late embryogenesis abundant (LEA) protein gene regulation during Arabidopsis seed maturation. **Journal of Plant Physiology**, v.158, p.419-427, 2001.

DONADON, J.R.; RESENDE, O.; TEIXEIRA, S.P.; JAIME MAIA DOS SANTOS, J.M.; MORO, F.V. Effect of Hot Air Drying on Ultrastructure of Crambe Seeds. **Drying Technology**, v. 31, p. 269–276, 2013.

DUBOIS, M. GILLES, K. A. , HAMILTON, J. K. , REBERS, P. A. , SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EDMOND, J. B.; DRAPALLA, W. J. . The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.71, p.428-443, 1958.

ELLIS, R.H., HONG, T.D., ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, p.1167-1174, 1990.

FERREIRA, G.; ERIG, P.R.; MORO, E. Uso de ácido giberélico em sementes de frutadão-conde (*Annona squamosa* L.) visando à produção de mudas em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.1, p.178-182, 2002.

FERREIRA, G.; GUIMARÃES, V.F.; PINHO, S.Z.; OLIVEIRA, M.C.; RICHART, A.; BRAGA, J.F.; DIAS, G.B. Curva de absorção de água em sementes de atemóia (*Annona cherimola* MILL. x *Annona squamosa* L.) CV. 'Gefner'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28, n.1, p. 121-124, 2006.

FERREIRA, G. **Reguladores vegetais na superação da dormência, balanço hormonal e degradação de reservas em sementes de *Annona diversifolia* Saff. E *A. purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal (Annonaceae)**. 2011. 101f. Tese (Livre-Docência). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FERREIRA, G., GIMENEZ, J. I., CORSATO, J. M., OLIVEIRA, M. C. Germinação de sementes de anonáceas. In: FERREIRA, G., KAVATI, R., BOARO, C. S. F., FERRARI, T. B., LEONEL, S. Anonáceas: Propagação e produção de mudas. Editora FEPAF, 2013.

GARCIA, I.S.; SOUZA, A.; BARBEDO, C.J.; DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of

*Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology** v.66, p.739-745, 2006.

GEET, O.H.; PROBERT, R.J.; COOMBEER, S.A. 'Dehydrin-like' proteins and desiccation tolerance in seeds. **Seed Science Research**, v.4, p.135-141, 1994.

GOMES, F.P. 1990. **Curso de Estatística Experimental**, Nobel, São Paulo, 468p.

GARNCZARSKA, M., ZALEWSKI, T., WOJTYLA, L. A comparative study of water distribution and dehydrin protein localization in maturing pea seeds. **Journal of plant Physiology**, v.165, p.1940-1946, 2008.

GREGGAINS, V.; FINCH-SAVAGE, W.E.; QUICK, W.P.; ATHERTON, N.M. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, v.148, p.267-276, 2000.

GRUWEZ, R.; LEROUX, O.; DE FRENNE, P.; TACK, W.; VIANE, R.; VERHEYEN, K. Critical phases in the seed development of common juniper (*Juniperus communis*). **Plant Biology**, v.15, p.210–219, 2013.

HADAS, A. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.27, 1976.

HAND, S.C.; MENZE, M.A.; TONER, M.; BOSWELL, L.; MOORE, D. LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. **Annu. Rev. Physiol.**, v.73, p.115–34, 2011.

HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.125, p.189-98, 1968.

HELLMANN, M.E.; MELLO, J.I.de O.; BARBEDO, C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C.L. Variações dos carboidratos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) armazenadas sob diferentes temperaturas. **Hoehnea**, v.35, n.2, p.255-264, 2008.

HENDRY, G.A.F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, v.3, p. 141-153, 1993.

HINCHA, D.K., POPOVA, A.V., CACELA, A. Effects of sugars on the stability of lipids membranes during drying. In **Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes**, (ed. L.A. Leitmannova), v.3, p.189-217, 2006, Elsevier, Amsterdam.

HOEKSTRA, F.; HAIGH, A.; TETTERO, F.; van ROEKEL, T. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. **Seed Science Research**, v.4, n.2, p.143-147, 1994.



HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Storage. In: **Tropical Tree Seed Manual**, USDA Forest Service's, Reforestation, Nurseries, & Genetics Resources, 2003.

HONG, T.D., LININGTON, S., ELLIS, R.H. Seed storage behaviour: a compendium. Rome: **International Plant Genetic Resources Institute**, 1996.

IIDA, Y.; WATABE, K.; KAMADA, H.; HARADA, H. Effects of abscisic acid on the induction of desiccation tolerance in carrot somatic embryos. **Journal of Plant Physiology**, v. 140, p. 356-360, 1992.

ILLING, N.; DENBY, K.J.; COLLETT, H.; SHEN, A.; FARRANT, J.M. The Signature of Seeds in Resurrection Plants: A Molecular and Physiological Comparison of Desiccation Tolerance in Seeds and Vegetative Tissues **Integr. Comp. Biol.**, v.45, p.771-787, 2005.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. In: ISTA. **International Rules for Seed Testing**. Bassersdorf: ISTA, 2004. p.5.1- 5.5; 5A.1- 5A.50.

JENSEN WA. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: W.H. Freeman, 408p.

JIANG Y, HUANG B. Protein alterations in response to water stress and ABA in Tall fescue. **Crop Sci**, v.7, p.42:202, 2002.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1940, 523p.

JOSÉ, A.C., Da SILVA, E.A.A., DAVIDE, A.C. MELO, A.J.S., TOOROP, P.E. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. seed viability. **Seed Sci. & Technol.**, v.39, p.425-434, 2011.

JUBES, J.T.; MARTINEZ, H.; PADILLA, E.; OSTE, C. A. Efectos de escarificación, medio, posición de siembra y ácido gibberellico, sobre la germinación de semillas em cherimoyas (*Annona cherimola* Mill). **Revista Agronómica N.O. Argentina**, v.12, n. 1-2, p.161-171, 1975.

KAVATI, R.O. **A cultura da atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.)**. Campinas: Departamento de Comunicação e Treinamento (DCT) – SAA/CATI, 1997, 22p.

KAVATI, R. **Porta-enxertos em anonáceas**. In: FERREIRA, G., KAVATI, R., BOARO, C. S. F., FERRARI, T. B., LEONEL, S. Anonáceas: Propagação e produção de mudas. Editora FEPAF, 2013.

KOSTER, K. L.; LEOPOLD, A. C. Sugars and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v. 88, p.829-832, 1988.

KUNDU, M., SEET, R. Effect of maturation on seed quality in *Holoptelia integrifolia*. **Seed Sci. & Technol.**, v.39, p.402-411, 2011.

LABOURIAU, L.G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *S. hispanica* L. 1. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.59, n.1, p.37-56, 1987.

LABORIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria – Geral da OEA, Série Biologia, Monografia 24, 1983.

LEDUC, S.N.M.; SILVA, J.P.N.; GASPAR, M.; BARBEDO, C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Non-structural carbohydrates of immature seeds of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) are involved in the induction of desiccation tolerance. **Australian Journal of Botany**, v.60, p.42–48, 2012.

LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, v.3, p.231-246, 1993.

LINKIES, A., GRAEBER, K., KNIGHT, C., LEUBRRER-METZGER, G. The evolution of seeds. **New Phytologist**, v.186, p.817-831, 2010.

LULSDORF, M.M.; YUAN, H.Y.; SLATER, A.M.H.; VANDENBERG, A. Endogenous hormone profiles during early seed development of *C. arietinum* and *C. anatolicum*. **Plant Growth Regul.**, v.71, p.191–198, 2013.

MA, L.; ZHANG, H.; XU, W.; HE, X.; YANG, L.; LUO, Y.; HUANG, K. Simultaneous Determination of 15 Plant Growth Regulators in Bean Sprout and Tomato with Liquid Chromatography–Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **Food Anal. Methods**, v.6, p.941–951, 2013.

MAAS, P.J.M.; KAMER, H.M.; JUNIKKA, L.; SILVA, R.M.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. Disponível em: [http://www.jbrj.gov.br/publica/rodriguesia/Rodrig52\\_80/6-maas.pdf](http://www.jbrj.gov.br/publica/rodriguesia/Rodrig52_80/6-maas.pdf) Acesso em 25/09/2006.

MACHADO, J.W.B.; PARENTE, T.V. Germinação de seis espécies frutíferas nativas do cerrado em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 8, n.1, p. 35-38, 1986.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. FEALQ, Piracicaba, 2005, 495p.

MAZIA, D.; BREWER, P.A.; ALFERT, M. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. **Biological Bulletin**, v.104, p.57-67, 1953.

MELO, D.L.B.; DAVIDE, A.C.; da SILVA, E.A.A.; FARIA, J.M.R.; QUEIROZ, S.E. Estudo morfo-anatômico do endosperma e embrião de sementes de *Annona crassiflora* Mart. **Revista Cerne**, 2007.

MELLO, J.I.O., CETENO, D.C., BARBEDO, C.J. FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperate. **Seed Science & Technology**, v.39, p.465-480, 2011.

MISCHAN, M.M. & PINHO, S.Z. de. **Experimentação Agronômica-Dados Não Balanceados**. Fundibio, Botucatu, SP. 456p. 1996.

NAGEL, M.; BORMER, A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. **Seed Science Research**, v.20, p.1-12, 2010.

NAMBARA, E.; MARARION-POLL, A. Abscisic Acid Biosynthesis and Catabolism. **Annual Review Plant Biology**, v.1, p.165-185, 2010.

NAMBARA, E., OKAMOTO, M., TATEMATSU, K., YANO, R., SEO, M., KAMIYA, Y., Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. **Seed Research**, v.20, p. 55-67, 2010.

Nishizawa, A., Yabuta, Y. and Shigeoka, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* **147**, 1251-1263.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N.; MCCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* **59**: 368-373.

OLIVEIRA, M.C. **Germinação de sementes de atemóia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.) submetidas a tratamentos com ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e Ethephon**. 73 p. Dissertação (Mestrado), Unioeste, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2004.

OLIVEIRA, I.V.M.; CAVALCANTE, I.H.L. MARTINS, A.B.G. Armazenamento de sementes de doviális (*Dovyalis caffra*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n.3, p.539-541, 2006.

OZTURK Z.N.; TALAME V.; DEYHOLOS M.; MICHALOWSKI C.B.; GALBRAITH D.W.; GOZUKIRMIZI N. Monitorin glarge scalechanges ntranscript abundance in drought and salt stressed barley. **Plant Mol Bio.**, v.48: p.551-73, 2002.

PAMMENTER N.W., BERJAK P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, v.10, p.301-306, 2000.

PAMPLONA, R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. **Biochimica et Biophysica Acta** **1777** (2008) 1249 – 1262.

- PAOLI, A.A.S, SARTI, J. Morfoanatomia e desenvolvimento de frutos e sementes de *Dodonea viscosa* (L.) Jacquin (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.30, n.2, p.033-042, 2008.
- PAWSHE, Y.H.; PATIL, B.N.; PATIL, L.P. Effect of pregermination seed treatment on the germination and vigour of seedlings in custard apple (*Anona squamosa* L.). **Annals of plant physiology**, v.11, n.2, p. 150 – 154, 1997.
- PUKACKA, S.; WÓJKIEWICZ, E. Carbohydrate metabolism in Norway maple and sycamore seeds in relation to desiccation tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v.159, p.273–279, 2002.
- RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.St.-Hil. **Annals Naturhist. Mus. Wien**, v.108, p.191-205, 2007.
- RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **C. R. Biologies**, n.331, p.796–805, 2008.
- RATHI, S. S.; SHAH, N. G.; ZAMBRE, S. S.; KALBANE, V. H.; VENKATESH, K. V. Respiration, sorption and germination of seeds stored in controlled atmosphere. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 28, n. 2, p. 314-348. 2000.
- ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499-514, 1973.
- ROSA, S.D.V.F. da; PINHO, E.R.V.; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.
- SAMARAH, N.H., AL-MAHASNCH, M.M., GHOSHEH, H. Z., ALQUDAH, A.M. TURK, M. The influence of drying methods on the acquisition of seed desiccation tolerance and the maintenance of vigour in wheat (*Triticum durum*). **Seed Sci. & Technol.**, v. 38, p.193-208, 2010.
- SÃO JOSÉ, A. R. Aspectos gerais das anonáceas no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A.R. et al. (Eds.). **Anonáceas: produção e mercado**. Vitória da Conquista: UESB, 1997.
- SASS JE. 1951. Botanical microtechnique. Iowa: State University Press, 228p.
- SCALON, S de P. Q.; SCALON FILHO, H; RIGONI, M. R. Armazenamento e germinação de sementes de uvaia *Eugenia uvalha* Cambess. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, p. 1228-1234, 2004.
- SILVA, J.B.; NAKAGAWA, J. Estudos de fórmulas para cálculo de velocidade de germinação. **Informativo Abrates**, v.5, p.62-73, 1995.
- SILVA, E.A.A.da; MELO, D.L.B.de; DAVIDE, A.C.; BODE, N. de; ABREU, G.B.; FARIA, J.M.R.; HILHORST, H.W.M. Germination Ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, v.99, p.893-830, 2007.

SINGH, D.P.; FILARDO, F.F.; STOREY, R.; JERMAKOW, A.M.; YAMAJUCHI, S.; SWAIN, S.M. Overexpression of a gibberellin inactivation gene alters seed development, KNOX gene expression, and plant development in *Arabidopsis*. **Physiol Plant**, v.138, p.74–90, 2010.

SMET, S. DE; DAMME, P. VAN; SCHELDEMAN, X.; ROMERO, J. Seed structure and germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.497, p.269-278, 1999.

SOCOLOWSKI, F.; CICERO, S.M. Use of growth regulators to overcome seed dormancy in *Xylopia aromatica* (Annonaceae). **Seed Sci. & Technol.**, v.39, p.21-28, 2011.

STENZEL, N.M.C.; MURATA, I. M.; NEVES, C. S. V. J. Superação da dormência em sementes de atemóia e fruta-do-conde. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v.25, n.2, p.305-308, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, Amsterdam, v. 153, p. 65-72, 2000.

TETTEROO, F.A.A.; BOMAL, C.; HOEKSTRA, F.A.; KARSSSEN, C.M. Effect of abscisic acid and slow drying on soluble carbohydrate content in developing embryoids of carrot (*Daucus carota* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Seed Science Research**, v.4, p.203-210, 1994.

TOKUNAGA, T. **A cultura da Atemóia**. Campinas: CATI, p. 80, 2000. (Boletim técnico, 233).

TOMMASI, F.; PACIOLLA, C.; ARRIGONI, O. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. **Physiology Plantarum**, v.105, p.193-198, 1999.

YANG, Q.H., LAN, Q.Y., YANG, H.S., TAN, Y.H. and YE, W.H. Germination, desiccation, storage and germination-accelerating pretreatment of *Ardisia virens* seeds. **Seed Sci. & Technol.**, v.39, p.327-337, 2011.

UEMURA, M.; STEPONKUS, P.L. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplast isolated from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**, v.26, p. 1083-1096, 2003.

VALENZUELA, J.R.C.; OSORIO, J.D.B. Efecto del ácido giberélico y el método de siembra em la germinación de semillas y crecimiento de plántulas de anona colorada (*Annona reticulata* L.). **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v.51, n.2, p. 235 – 244, 1998.

VEIGA, A.D.; GUIMARÃES, R.M.; ROSA, S.D.V.F. da; PINHO E. V. de R. V.; SILVA L. H. de C. E.; VEIGA, A.D. Armazenabilidade de sementes de caféiro

colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.83-91, 2007.

VERTUCCI, C.W.; ROOS, E.E. Seed storage temperature and relative humidity. **Seed Science Research**, v.3, p.215-216, 1993.

VIEIRA RD, KRZYZANOWSKI FC. 1999. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI FC; VIEIRA RD; FRANÇA NETO JB (eds). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES. cap.4. p.1-26.

VIDIGAL, D. de S.; DIAS, D. C. F. dos S.; NAVEIRA, D. dos S. P. C.; ROCHA, F. B.; M. C. BHERING. Qualidade fisiológica de sementes de tomate em função da idade e do armazenamento pós-colheita dos frutos. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.87-93, 2006.

VIDIGAL, D.S.; DIAS, D.C.F.S.; PINHO, E.V.R.V.; DIAS, L.A.S. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n.2, p.129-136, 2009.

VILLELA, F.A.; PERES, W.B. Coleta, secagem e beneficiamento de sementes. In: FERREIRA, A.G.; BORGUETTI, R. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: ARTMED, p.265-281, 2004.

VOLAIRE F. Drought survival, summer dormancy and dehydrin accumulation in contrasting cultivars of *Dacylis glomerata*. **Physiol Plant**, v.116: p.42–51, 2002.

WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12 (Edição especial):p.7-21, 2000.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, v.11, p.135-148, 2001.

WALTERS, C. BERJAK, P. PAMMENTER, N. KENNEDY, K. RAVEN, P. Preservation of Recalcitrant Seeds. **Science**. 339, 915 (2013).

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular Physiology of Legume Seed Development. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.56, p.253–279, 2005.

WISE, J.M.; TUNNACLIFFE, A. POPP the question: what do LEA proteins do? Trends in Plant Science, London, v. 9, p. 13-17. 2004.

ZHAO, Y. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.61, p.49–64, 2010.

#### 4. CAPÍTULO 1

### DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Artigo nas normas do periódico: Journal of Experimental Botany.

## DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER

Jaqueline Malagutti Corsato<sup>1\*</sup>; Gisela Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UNESP, Caixa Postal 510, Botucatu, CEP: 18608-970, São Paulo, Brasil. e-mail [gisela.unesp@yahoo.com.br](mailto:gisela.unesp@yahoo.com.br)

\*Autor para correspondência. e-mail [jaque\\_corsato@hotmail.com](mailto:jaque_corsato@hotmail.com), Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Caixa Postal 510, Botucatu, CEP: 18608-970, São Paulo, Brasil

**Resumo:** O desenvolvimento das sementes representa um estágio crítico no ciclo de vida das plantas o qual é controlado geneticamente e pela ação hormonal. A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum-de-terra-fria) é utilizada como portaenxerto principalmente para a atemóia (*Annona cherimolla* Mill. x *Annona squamosa* L.), porém, suas sementes têm apresentado dormência que varia entre os ciclos de produção de sementes. O objetivo do trabalho foi descrever o desenvolvimento das sementes de *A. emarginata* com vistas a maturação fisiológica. Foram realizadas coletas aos 49, 91, 116 e 133 DAF. Os frutos foram analisados quanto a massa (mg), diâmetro (mm), comprimento (mm), pH, sólidos solúveis totais (°Brix) e massa seca das sementes (mg). As sementes em diferentes estádios de desenvolvimento foram submetidas às análises anatômicas, determinação do teor de água inicial, teste de germinação e análises bioquímicas (açúcares solúveis totais; proteínas LEA; atividade da peroxidase e superóxido dismutase; teores de lipoperóxido, perfil hormonal). Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5%. Observamos aos 49 DAF que as sementes são caracterizadas pela elevada divisão celular no embrião, aos 91 DAF elas adquirem capacidade germinativa, seguida de máximo acúmulo de massa seca aos 116 DAF, sendo dispersas aos 133 DAF. Concluímos que o a maturidade fisiológica das sementes de *A. emarginata* é alcançada aos 116 DAF e quando dispersas aos 133 DAF não apresentam dormência.

**Palavras-chave:** araticum-de-terra-fria, anatomia, acúmulo de massa seca, sistemas antioxidantes, níveis hormonais.



## **Introdução**

O desenvolvimento das sementes representa um estágio crítico no ciclo de vida das plantas o qual é controlado geneticamente e pela ação hormonal (auxinas, giberelinas, citocininas e ABA), envolvendo uma sequência ordenada de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem a partir da fecundação do óvulo até o desligamento da semente madura da planta mãe (Waterworth e Bray, 2007).

A primeira fase do desenvolvimento chamada de crescimento inicial, é caracterizada pelo elevado teor de água, inúmeras divisões celulares, além da histodiferenciação e morfogênese do plano básico do embrião (Waterworth e Bray, 2007). Nesta fase as sementes ainda não possuem capacidade de germinar (Gruwez et al., 2013). Após este crescimento inicial, ocorre uma fase intermediária, na qual as sementes aumentam de tamanho devido à expansão celular e deposição de reservas, principalmente açúcares, lipídeos e proteínas, cujas proporções variam entre as espécies (Weber et al., 2005).

Com a deposição de reservas a massa seca das sementes aumenta, se estabiliza enquanto o teor de água nas sementes é reduzido (Bewley et al., 2013). Nesta terceira fase, também conhecida como maturação, um grupo de sementes passa por período pré-programado de secagem (ortodoxas ou tolerantes à dessecação), enquanto outro grupo, apresenta sementes que são dispersas com teores de água elevados e completa capacidade de germinação, sendo chamadas de recalcitrantes ou intolerantes à dessecação (Walters, 2000).

Nas sementes que toleram secagem os açúcares, tais como a glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose, além de serem fonte de energia para o crescimento do embrião durante a germinação, também podem proteger o sistema de membranas celulares dos danos gerados pela perda de água durante a dessecação, devido a formação de um estado viscoso, o qual auxilia na redução da atividade metabólica celular (Hincha et al., 2006).

Além dos açúcares, a tolerância à dessecação pode estar relacionada com a produção de um grupo de proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), acumuladas nas últimas fases da maturação em resposta ao acúmulo de ABA nas sementes ortodoxas, e que desempenham papel protetor às células no estado seco (Blackman et al., 1991; Walters et al., 2001; Rosa et al., 2005; Pammenter e Berjak, 2000).

Todo o processo de desenvolvimento das sementes promove a formação de radicais livres, os quais podem reagir com o sistema de membranas celulares, levando a

danos irreversíveis e até mesmo à morte celular durante a redução natural do conteúdo de água. Sendo assim, há necessidade de um sistema antioxidante eficiente ao longo de todo o processo, com destaque para as enzimas como a peroxidase e superóxido dismutase, a fim de evitar danos celulares (Buitink e Leprince, 2008; Rajjou e Debeaujon, 2008).

De modo geral, as sementes completam seu desenvolvimento antes do máximo desenvolvimento dos frutos e podem ser dispersas dormentes ou quiescentes (Bewley et al., 2013). As sementes de Annonaceae são conhecidas por apresentarem dormência morfológica com presença de embriões indiferenciados e/ou rudimentares observados em *A. crassiflora* (Rizzini, 1973) e dormência fisiológica em *Annona diversifolia* (Ferreira, 2011).

Em sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer (araticum-de-terra-fria), importante espécie para ser utilizada em programas de melhoramento genético, para a recuperação de áreas degradadas e como portaenxerto principalmente para a atemóia (*Annona cherimolla* Mill. x *Annona squamosa* L.) (Bonaventure, 1999; Tokunaga, 2000; Kavati, 2013), também tem sido observada dormência (Costa et al., 2011). No entanto, a cada ano este comportamento não tem sido padrão (Costa et al., 2011; Corsato et al., 2012), o que nos levou a hipótese de que a baixa porcentagem de germinação pode estar relacionada a imaturidade dessas sementes no momento da coleta e não necessariamente ao estabelecimento de dormência.

Deste modo, o objetivo do trabalho foi descrever as fases do desenvolvimento das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer com vistas a maturação fisiológica.

### **Material e Métodos**

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Fisiologia da Germinação e Dormência de Sementes do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, *campus* de Botucatu – SP.

Durante o período de floração das plantas de araticum-de-terra-fria foram marcadas matrizes no Núcleo de Produção de Mudas da CATI, localizado em São Bento do Sapucaí – SP (22° 41'20" sul e a uma longitude 45° 43' 51" oeste, altitude de 886 metros), em dois ciclos (outubro de 2010 e outubro de 2011). Foram determinadas cinco épocas de coleta: 49, 91, 116 e 133 DAF (Dias Após a Floração), as quais abrangeram do início do desenvolvimento, até a dispersão dos frutos, resultando em dois ciclos de

avaliação, 2010/2011 e 2011/2012. Para cada época de coleta, os frutos foram analisados quanto à massa, diâmetro, comprimento, porcentagem de sólidos solúveis totais (°Brix), pH e massa seca das sementes.

A determinação do teor de água inicial das sementes de *A. emarginata* foi realizada utilizando quatro repetições de 25 sementes por parcela. As sementes foram acondicionadas em estufa de secagem com circulação forçada de ar à temperatura de 103°C durante 17 horas (Ista, 2004). Os resultados do teor de água das sementes foram expressos em porcentagem (%), com base no peso úmido das sementes conforme a metodologia descrita pela Ista (2004).

### **Teste de Germinação**

As sementes extraídas dos frutos foram submetidas ao teste de germinação em delineamento inteiramente casualizado, sendo considerado como tratamentos cada época de desenvolvimento dos frutos (49, 91, 116 e 133 DAF) com quatro repetições de 15 sementes por parcela. Sementes apresentando teor de água inicial, foram colocadas para germinar em papel de filtro (Germitest) umedecido com água destilada na proporção de duas vezes e meia o peso do papel seco (Brasil, 2009) e acondicionados em câmara de germinação com temperatura e fotoperíodo alternados, 20°C durante 18 horas de escuro e 30°C por seis horas de claro (Costa, 2009).

As avaliações quanto a germinação foram constituídas de contagem do número de sementes germinadas a cada dois dias, sendo considerado como germinada aquela que apresentou pelo menos 2 mm de raiz primária (Hadas, 1976). Foram calculadas as porcentagens, tempo médio (Edmond e Drapala, 1958), índice de velocidade (Silva e Nakagawa, 1995), frequência e sincronização da germinação (Laboriau e Agudo, 1987) e a porcentagem de plântulas normais (Brasil, 2009).

### **Análise Anatômica**

A análise foi realizada em sementes aos 49, 91, 116 e 133 DAF. A fixação das 3 sementes por tratamento foi realizada em FAA 50 (Johansen, 1940) por 48 horas, conservando-se as amostras em etanol 70% (Jensen, 1962). Para os estudos anatômicos, as amostras fixadas foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Leica®), sendo seccionadas em micrótomo rotativo com cerca de 8µm de espessura, obtendo-se séries transversais e longitudinais. As lâminas foram coradas com Azul de

Toluidina a 0,05% em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien et al., 1964) e montadas em resina sintética.

Para identificar polissacarídeos diversos e pectinas, foi utilizado o vermelho de rutênio (Jensen, 1962); para evidenciar paredes lignificadas, floroglucinol em meio ácido (Sass, 1951); lugol, para a detecção de amido (Johansen, 1940); cloreto férrico, para verificar a ocorrência de compostos fenólicos (Johansen, 1940); e, para localizar proteínas, foi utilizado azul mercúrio de bromofenol (Mazia et al., 1953). O laminário produzido foi analisado em microscópio de luz, sendo as imagens obtidas digitalmente em fotomicroscópio Olympus®.

### **Análises Bioquímicas**

Para todas as análises descritas à seguir foi utilizado delineamento experimental inteiramente casualizado com 4 tratamentos (49, 91, 116 e 133 DAF) e três repetições por análise.

### **Açúcares solúveis**

Para a extração dos açúcares solúveis foram utilizados 100mg de semente inteira macerada, foi acondicionada em tubos eppendorf, onde foi adicionado 1 mL de etanol 80% na proporção de 10:1. Os tubos foram incubados em banho a 80°C por 15 minutos (Dubois et al., 1956). Após incubação, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para tubos com capacidade de 5 mL. O mesmo procedimento foi repetido duas vezes com o substrato restante e o volume final do extrato foi ajustado para 3mL. A união dos três sobrenadantes resultou no extrato com a fração de açúcares solúveis que foi analisada.

Após a extração do material foi realizada a determinação dos açúcares solúveis totais pelo método do fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956). Para a purificação das amostras foi utilizado 1ml de amostra, a qual passou em resina catiônica e aniônica. O pH das amostras foi corrigido com hidróxido de amônio e ácido clorídrico e, posteriormente, estas foram armazenadas em freezer (Garcia et al., 2006). As amostras foram liofilizadas e suspendidas em 1ml de água deionizada. As amostras foram aplicadas na coluna de dosagem CARBO PAC1 (2 x 250 mm) e, então, determinado o perfil de açúcares solúveis das amostras (Garcia et al., 2006).

### **Proteínas LEA**

Para a extração de proteínas LEA foi seguida a metodologia descrita por Rosa et al. (2005). As sementes inteiras foram maceradas em tampão de extração 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 mM do inibidor de protease PMSF na proporção de 1:10 (peso do material: volume do tampão). O material foi centrifugado a 12000 rpm à 4°C por 45 minutos e o sobrenadante incubado em banho Maria a 85°C por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante resultou na fração de proteínas LEA.

80 µL de tampão da amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46g SDS, 20mg de azul de bromofenol, Tris-HCl pH = 7,5) foram adicionados em 20 µL de cada extrato, seguido de uma incubação em banho-maria com água em ebulição por cinco minutos. Foram aplicados 10 µL de cada amostra em gel de poliacrilamida 12,5% (gel separador) e 4% (gel de empilhamento). A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical à temperatura ambiente e voltagem constante de 50V por cinco horas. Após a corrida, os géis foram corados em solução de Comassie Brilliant Blue a 0,05% por 24 horas e descoradas com solução de etanol a 5%, ácido acético 10% e água 85%, conforme Alfenas (1988).

Os géis foram salvos e suas imagens digitalizadas através do Image Master VDS e software analisador de imagens do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP, *campus de Botucatu* - SP. O programa foi utilizado para determinar o IOD (intensidade de densidade óptica de cada banda proteica) e os resultados foram expressos em intensidade de bandas.

### **Lipídeos Totais**

A quantidade de lipídeos presente nas sementes de *A. emarginata* foi obtida pela extração com hexano em um aparelho extrator Soxhlet por 8 horas (método descrito pela AOCS Bc 3-49 (AOCS, 1993)). Para 1 grama de semente inteira macerada, 130 ml do solvente foram utilizados. Após a extração, o solvente foi evaporado através de um rotavapor. O método foi repetido mais três vezes e a fração de lipídeos totais determinada pela massa de lipídeos gerada.

### **Proteínas solúveis totais**

Para a extração das proteínas solúveis totais foi seguida a metodologia de Kar e Mishra (1976). Foram utilizados 600 mg de sementes inteiras, as quais foram trituradas

em nitrogênio líquido homogeneizados com a auxílio de um almofariz em 5mL de tampão de extração fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8. O macerado centrifugado à 12000 rpm por 40 minutos. A determinação das proteínas solúveis totais foi realizada pelo método de Bradford (1976).

#### **Atividade da enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)**

A atividade da peroxidase foi determinada de acordo com as condições citadas no trabalho de Teisseire e Guy (2000). O sistema de reação foi composto de 100 uL de extrato enzimático diluído no tampão de extração; tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,5; pirogalol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol.L<sup>-1</sup> e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 5 mmol L<sup>-1</sup>. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 5 minutos e resulta na formação de purpurugalina, a qual foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430nm e seu coeficiente de extinção molar (2,47 mmol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em umol de purpurugalina min<sup>-1</sup> de proteína.

#### **Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi realizada pelo método de Beauchamp e Fridovich (1971), citados por Bor et al. (2003). O sistema de reação é foi composto de 30µL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,8, mistura “nitrobluetetrazolium” (NBT) 33 µmol L<sup>-1</sup> + EDTA 0,66 mmol L<sup>-1</sup> (5:4) e mistura L-metionina 10 mmol L<sup>-1</sup> + riboflavina 3,3 mol L<sup>-1</sup> (1:1), totalizando um volume de 3,0mL. Após iluminação dos tubos por 5 minutos a 25°C, a redução do NBT a “blue formazan” foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 560 nm. A atividade da SOD foi expressa em U mg<sup>-1</sup> de proteína.

#### **Teores de lipoperóxido**

Os níveis de peroxidação de lipídeos foram avaliados utilizando a metodologia de Heath e Packer (1968). Para isso, foram utilizados 100 mg de sementes inteiras as quais foram maceradas em almofariz adicionando-se 2ml de um meio de reação constituído por ácido tiobarbitúrico (0,25%, m/v) e ácido tricloro acético (10%, m/v). A solução foi acondicionada em tubos de ensaio vedados e incubados em banho-maria a 95°C por 1 hora. A solução resultante foi centrifugada a 12000 rpm por 40 minutos a 25°C. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro em dois

comprimentos de onda 532 e 600nm. O montante de malondialdeído (MDA) formado foi calculado utilizando um coeficiente de extinção de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **Hormônios**

Para a extração e quantificação dos hormônios (ABA, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, IAA, 6-BA, trans-zeatina e IBA) foi adaptada a metodologia de Ma et al., 2013. Foram utilizados 100mg de material acondicionado em tubos eppendorf, onde foi adicionado 1 mL da solução contendo: 40mL de metanol: 40mL de acetonitrila : 20mL de água Milli-Q : 1mL de ácido acético, na proporção de 10:1. Os tubos foram agitados em Vortex por 2 minutos, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para tubos com capacidade de 2mL. O mesmo procedimento foi repetido mais uma vez com o substrato restante e o volume final do extrato foi ajustado para 2mL. A união dos dois sobrenadantes resultou no extrato com a fração de hormônios que foi analisada por cromatografia de alta performance (HPLC).

A separação cromatográfica foi feita em um HPLC Shimadzu modelo Prominence composto dos seguintes módulos: Desgaseificador de fase móvel DGU-20A, sistema de bombeamento quaternário composto pelas bombas LC-20AD, autoamostrador modelo SIL-20ACHT, controlador CBM-20A e forno para colunas modelo CTO-20AC. Foi usada uma coluna Sinergi 2.5 um Hydro RP-100A 50x4.6mm. A coluna foi mantida a temperatura de 40°C durante as determinações. O efluente da coluna foi introduzido em um Espectrômetro de Massas do tipo Triploquadrupolo (MS/MS) marca AB Sciex modelo 4500 equipado com fonte de ionização tipo ESI (eletrospray) na interface.

### **Resultados**

Os dois ciclos estudados (outubro de 2010 e outubro de 2011) apresentaram o mesmo padrão de resposta, por esse motivo os resultados apresentados à seguir refere-se apenas ao ciclo referente à outubro de 2010 até fevereiro de 2011.

Os frutos de *A. emarginata* apresentaram o mesmo padrão de desenvolvimento nos dois ciclos estudados (2011 e 2012). A massa fresca e o diâmetro dos frutos, aumentaram até os 116 DAF e reduziram aos 133 DAF. Foi observado que o pH dos frutos foi reduzido aos 116 e 133 DAF e ocorreu um acúmulo de sólidos solúveis nos frutos até 116 DAF estabilizando-se (Tabela 1).

O teor de água inicial das sementes aos 49 DAF foi de 77% e, à medida que se desenvolveram, o teor de água diminuiu, sendo dispersas com 27% de água (133 DAF). Ao mesmo tempo que ocorreu redução no teor de água ao longo do desenvolvimento, observamos aumento da massa seca das sementes até 116 DAF (Figura 1).

Ao analisarmos os compostos presentes nas sementes, verificamos que os níveis de açúcares solúveis totais é maior aos 49 DAF, sofre uma redução aos 91 DAF e volta a aumentar aos 116 DAF (Figura 2A), sendo que o conteúdo de ciclitóis, glicose e frutose reduzem à medida que as sementes se desenvolvem, enquanto os níveis de sacarose são aumentados (Figura 3). Já os níveis de proteínas solúveis totais (Figura 2B) e de lipídeos totais (Figura 2C), aumentam à medida que a semente se desenvolve.

No início do desenvolvimento, aos 49 DAF, o tegumento das sementes de *A. emarginata* apresenta várias camadas de células com paredes pécnicas (Figura 4A) pouco espessadas, sendo que as células da camada mais externa apresentam espessamento parietal um pouco maior. O tegumento das sementes de *A. emarginata* apresenta invaginações no endosperma, caracterizando um endosperma ruminado (Figura 4B).

O endosperma aos 49 DAF apresenta células de formatos e tamanhos variados, paredes delgadas e núcleos evidentes (Figura 4B). Observa-se que as camadas periféricas do endosperma encontram-se ainda em celularização. Os testes histoquímicos não demonstraram reação para amido (lugol) e substâncias pécnicas, sendo positivo apenas para proteínas (azul mercúrio de bromofenol), mostrando o início do acúmulo de proteínas no tecido de reserva das sementes (Figura 4C). As sementes apresentam em sua constituição açúcares, proteínas e lipídeos (Figura 2), com elevadas concentrações de glicose, frutose e ciclitóis enquanto as concentrações de sacarose eram baixas (Figura 3).

O embrião apresenta-se globular, formado por células de parede delgadas, citoplasma denso e núcleos evidentes, caracterizando células em divisão celular (Figura 4D). Neste estágio de desenvolvimento observamos as maiores concentrações de GA<sub>3</sub>, trans-zeatina, IAA e ABA (Figura 6), assim como as maiores atividades da peroxidase (Tabela 3). Nesta fase, as sementes de *A. emarginata* ainda não haviam adquirido capacidade de germinar (Tabela 2 e Figura 5).

Com o decorrer do desenvolvimento das sementes observamos aos 91 DAF aumento na espessura da parede celular no tegumento seminal (figura 4E). O endosperma encontra-se totalmente celularizado com conteúdo celular mais denso



(Figura 4F). Os testes histoquímicos demonstraram reação positiva apenas para proteínas, evidenciando a deposição dessa reserva nas células do endosperma (Figura 4G). Além do acúmulo de proteínas solúveis totais (Figura 2), observamos também aumento no número de proteínas da embriogênese tardia (LEA), inclusive aquelas com peso molecular por entre 60 a 40 KDa (Figuras 7B, &C e 7D).

Uma grande mudança é observada no embrião nesta fase, diferentemente do início do desenvolvimento aos 49 DAF, nele já se reconhece eixo embrionário e cotilédones vascularizados (Figura 4F). É adquirida a capacidade de germinação (Tabela 2), enquanto a redução no conteúdo de água das sementes de *A. emarginata* é acompanhada do aumento na massa seca (Figura 1).

Com a redução da divisão celular, os hormônios GA<sub>3</sub>, trans-zeatina, IAA e ABA tiveram o seu conteúdo reduzido nas sementes aos 91 DAF, enquanto foi observado um pico de GA<sub>4</sub>, evidenciando a formação do sistema vascular (Figura 6). Quanto ao sistema de enzimas antioxidantes, verificamos redução para a atividade da peroxidase enquanto a peroxidação de lipídeos é mantida baixa (Tabela 3).

Aos 116 DAF observa-se acentuada lignificação nas células do tegumento seminal (figura 8I). Verificamos também nessa fase do desenvolvimento, aumento na deposição de proteínas no endosperma (Figura 8L), enquanto a estrutura do embrião manteve-se, sendo observado apenas crescimento em comprimento para o embrião (Figura 8J).

O aumento na massa seca observado aos 116 DAF (Figura 1) é devido ao rápido crescimento da semente e do acúmulo significativo de açúcares solúveis e lipídeos (Figura 2), indicando fase intermediária do desenvolvimento. Os níveis de glicose, frutose e ciclitóis são reduzidos significativamente, enquanto o conteúdo de sacarose aumenta (Figura 3). A germinação manteve-se elevada, porém ocorrendo de modo não sincronizado (Tabela 2 e Figura 5), enquanto a intensidade das proteínas LEA aumentaram (Figura 7).

Os hormônios GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, trans-zeatina, ABA e IAA tiveram suas concentrações reduzidas aos 116 DAF, sendo observado aumento significativo apenas na concentração de 6-BA (Figura 6). Quanto à atividade da peroxidase e os níveis de peroxidação de lipídeos, observamos que estas variáveis mantiveram-se inalteradas (Tabela 3).

Quando dispersas, aos 133 DAF foram observadas poucas alterações anatômicas, com destaque apenas para o tegumento seminal intensamente lignificado e o endosperma apresentando evidentes grãos de proteínas (Figura 8M). Nesta fase, a

germinação não diferiu das porcentagens apresentadas nas demais fases do desenvolvimento (91 e 116 DAF) (Tabela 2 e Figura 5) e o conteúdo de proteínas e lipídeos mantiveram-se elevadas (Figura 2). Apesar, da redução no conteúdo de açúcares solúveis totais (Figura 2), observamos que os níveis de sacarose mantiveram-se elevados, enquanto os teores de glicose, frutose e ciclitóis continuaram a reduzir (Figura 3).

O conteúdo de todos os hormônios analisados foi reduzido aos 133 DAF (Figura 6). Nesta fase, houve uma redução no número de bandas de proteínas LEA (Figura 7), a atividade da peroxidase manteve-se baixa, porém os níveis de peroxidação de lipídeos apresentaram um aumento significativo.

### **Discussão**

O desenvolvimento das sementes envolve uma série de eventos anatômicos e fisiológicos, sendo observado três fases distintas (Weber, 2005). A primeira fase consiste em uma série de divisões celulares e formação do plano básico do embrião (Waterworth e Bray, 2007), o que foi observado aos 49 DAF. Nesta fase o embrião das sementes de *A. emarginata* apresentava aspecto globular e células com citoplasma denso caracterizando uma fase de intensa divisão celular (Figura 4). Porém, o embrião não está formado, e por esse motivo não ocorre germinação (Tabela 2), o que coincide com elevadas concentrações de ABA (Figura 6), provenientes da planta mãe (Kanno et al., 2012; Finkelstein, 2013).

Aos 49 DAF as sementes apresentavam elevado teor de água (Figura 1), o qual é requerido para as divisões celulares, assim como a interação entre citocinina (trans-zeatina), auxina (IAA) e giberelinas (Lulsdorf et al., 2013), garantindo controle do processo de divisão e alongamento celular, nas fases de desenvolvimento inicial das sementes (embriogênese) (Zhao, 2010), principalmente quando os tecidos do embrião ainda não encontram-se totalmente diferenciados (Thomas et al., 2002; Bajguz e Piotrowska, 2009).

Segundo Singh et al. (2010), giberelinas ativas como a GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, e GA<sub>7</sub> regulam o desenvolvimento do embrião e do endosperma, sendo requeridas para a diferenciação e alongamento celular. Conteúdo de água elevado, altas taxas de divisão celular, início da formação do plano básico do embrião e elevada concentração de ABA, como verificado para as sementes de *A. emarginata* aos 49 DAF, são eventos característicos da fase I do desenvolvimento das sementes (Gruwez et al., 2013).

Aos 91 DAF observamos que as sementes já se encontravam na fase II do desenvolvimento, uma vez que o embrião apresentava tecidos diferenciados em eixo e cotilédone (Figura 4), capacidade para germinar, alcançando 77% de germinação (Tabela 2) e aumento na massa seca das sementes (Figura 1), devido principalmente ao incremento significativo das reservas proteicas, enquanto os açúcares solúveis são reduzidos e os lipídeos inalterados (Figura 2). Por ser uma fase onde o embrião está formado mas ainda há na semente aumento no número de células por divisão celular (Figura 4), a redução no conteúdo de açúcares verificada (Figura 2), pode estar relacionada com o fornecimento de energia para manter o desenvolvimento (Mello et al., 2010).

Além disso, O balanço hormonal na fase II (91 DAF) foi favorável à germinação, uma vez que se verificou redução do ABA e aumento nos níveis de GA<sub>4</sub> (figura 6), resultando na germinação de 77% (Tabela 2), o que reforça a proposta de que a germinação das sementes só ocorre quando os níveis de promotores da germinação, são maiores do que os inibidores (ABA) (Rajjou et al., 2012).

Concomitantemente ao início do acúmulo de reservas (Figura 2) nas sementes aos 91 DAF observamos também início do acúmulo de proteínas LEA (Figura 7), o que segundo Hand et al. (2011), somente ocorreria ao final da maturação. Aos 91 DAF esse aumento das bandas de LEA em relação aos 49 DAF indica que essas sementes tem tendência à serem tolerantes à dessecação, pois este é um dos mecanismos envolvidos com a capacidade em perder água sem gerar danos celulares (Berjak e Pammenter, 2007).

Quanto mais próximo à dispersão (dos 116 aos 133 DAF), maior a redução no conteúdo de água e aumento da massa seca das sementes (Figura 1). O conteúdo de ABA nas sementes de *A. emarginata* decresce ao longo do desenvolvimento (Figura 6), sendo observado que aos 116 DAF o máximo acúmulo de massa seca não é acompanhado de um segundo pico de ABA. Este segundo pico de ABA, seria o responsável por induzir a síntese de proteínas LEA, acúmulo de sacarose e oligossacarídeos, os quais tem função de manter a integridade celular durante a redução de água nas sementes (Rajjou et al., 2012; Finkelstein, 2013). Deste modo, em sementes de *A. emarginata* a síntese de proteínas LEA e acúmulo de sacarose não se relacionam ao aumento de ABA.

Além disto, observamos que o início do acúmulo de LEA e acúmulo de sacarose nas sementes de *A. emarginata* ocorre aos 91 DAF (figuras 3 e 7), antes mesmo da

máxima deposição de reservas. Sendo assim, a redução no conteúdo de água verificada aos 91 DAF deve servir como indutor para a produção e acúmulo dessas substâncias osmoprotetoras, permitindo que as sementes percam mais água, como ocorreu nas fases seguintes (116 e 133 DAF) sem levar à perda da integridade celular (Taiz & Zeigher, 2013).

Assim, quando as sementes são dispersas aos 133 DAF o conteúdo de água é baixo (27%), se comparado com o início do desenvolvimento (77%) aos 49 DAF (Figura 1) e a presença de proteínas LEA e sacarose acumuladas desde os 91 DAF (Figuras 6 e 7), devem proteger as membranas celulares para que a água continue sendo reduzida no ambiente. Além disso, a baixa concentração do ABA (Figura 6) aos 133 DAF indica que as sementes são dispersas sem dormência fisiológica (tabela 2). Diferente de *A. diversifolia* e *A. purpurea* que segundo Ferreira (2011) são dispersas com dormência devido a elevada concentração de ABA no momento da dispersão.

No entanto, apesar desta redução de ABA até a dispersão, a germinação só ocorre na natureza se além das condições do ambiente favoráveis à germinação, as sementes tenham a capacidade de produzir giberelinas no momento da embebição, senão, apesar da baixa concentração de ABA nas sementes, as sementes podem apresentar dormência fisiológica pela inabilidade em produzir promotores do processo (Baskin e Baskin, 2004; Bewley, 2013).

Vale ressaltar que todo o processo de desenvolvimento envolve uma série de eventos, que podem levar ao estresse oxidativo, caracterizado por danos irreversíveis e até mesmo à morte celular durante a redução natural do conteúdo de água (Rajjou e Debeaujon, 2008). Neste contexto, enzimas como a peroxidase e superóxido dismutase, auxiliam na remoção dos radicais livres gerados evitando a peroxidação de lipídeos e danos celulares (Buitink e Leprince, 2008). Dessa forma, durante o desenvolvimento das sementes de *A. emarginata* a baixa atividade das enzimas POD e SOD foi suficiente para manter o estresse oxidativo controlado (Tabela 3).

Assim, o estudo do desenvolvimento das sementes de *A. emarginata* demonstrou fase I (49 DAF) caracterizada pela presença de CK, AX e GA, garantindo a divisão celular, a fase II (91 DAF) caracterizada pelo embrião completo, início da deposição de reservas e de moléculas osmoprotetoras, e a fase III iniciada aos 116 DAF quando ocorre o máximo acúmulo de massa seca, sendo seguida da dispersão aos 133 DAF, com o embrião completo, desenvolvido e sem dormência evidente devido a redução do ABA.

A partir do estudo fica evidente que as sementes de *A. emarginata* não apresentam dormência morfológica, uma vez que o embrião é disperso completo, nem dormência fisiológica, pois as sementes apresentam elevado potencial germinativo no momento da dispersão (133 DAF). Desta forma, a dormência sazonal relatada nas sementes de *A. emarginata* pode ter sido estabelecida após a dispersão, o que seria uma dormência secundária, causada por algum nível de estresse, ou a coleta ter sido realizada antes das sementes atingirem maturidade fisiológica.

### Conclusão

Concluimos que a maturidade fisiológica das sementes de *A. emarginata* é alcançada aos 116 DAF e quando dispersas aos 133 DAF não apresentam dormência.

### Referências<sup>2</sup>

ALFENAS, A. C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 151-182.

BEAUCHAMP C., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem.**, v.44, n.1, p.276-87, 1971.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3 ed. New York: Springer, 2013. 392p.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. **Annals of Botany**. p. 1-16, 2007.

BLACKMAN, S. A.; WETTLAUFER, S. H.; OBENDORF, R. L.; LEOPOLD, A. C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean. **Plant Physiology**, v. 96, p. 868-874, 1991.

BONAVENTURE, L. El cultivo de la chirimoya e de su híbrido atemoya em Brasil. In: **First International Symposium on Cherimoya**, Equador, 1999.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regra de Análise de Sementes**. Brasília: departamento de produção vegetal, 2009, 398p.

---

<sup>2</sup> Referências nas normas da ABNT

- CARVALHO, N.M. **A secagem de sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 2005, 165p.
- BUITINK, J., LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **C. R. Biologies**, v,331, p.788–795, 2008.
- COPELAND, L.O.; McDONALD, M. **Principles of seeds science and technology**. New York: Chapman Hall, 1995. 409p.
- COSTA, P.N. **Reguladores vegetais, luz e temperatura na germinação de sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer)**. 2009. 78p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- DUBOIS, M. GILLES, K. A. , HAMILTON, J. K. , REBERS, P. A. , SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- EDMOND, J. B.; DRAPALLA, W. J. . The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.71, p.428-443, 1958.
- FINKELSTEIN, R. Abscisic Acid Synthesis and Response. **The Arabidopsis Book**, The American Society of Plant Biologists, 2013.
- GARCIA, I.S.; SOUZA, A.; BARBEDO, C.J.; DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology** v.66, p.739-745, 2006.
- GRUWEZ, R.; LEROUX, O.; DE FRENNE, P.; TACK, W.; VIANE, R.; VERHEYEN, K. Critical phases in the seed development of common juniper (*Juniperus communis*). **Plant Biology**, v,15, p.210–219, 2013.
- HADAS, A. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.27, 1976.
- HAND, S.C.; MENZE, M.A.; TONER, M.; BOSWELL, L.; MOORE, D. LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. **Annu. Rev. Physiol.**, v.73, p.115–34, 2011.
- HINCHA, D.K., POPOVA, A.V., CACELA, A. Effects of sugars on the stability of lipids membranes during drying. In **Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes**, (ed. L.A. Leitmannova), v. 3, p.189-217, 2006, Elsevier, Amsterdam.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. In: ISTA. **International Rules for Seed Testing**. Bassersdorf: ISTA, 2004. p.5.1- 5.5; 5A.1- 5A.50.
- JENSEN WA. 1962. Botanical histochemistry: principles and practice. San Francisco: W.H. Freeman, 408p.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1940, 523p.

KANNO, Y., HANADA, A., CHIBA, Y., ICHIKAWA, T., NAKAZAWA, M., MATSUI, M. KOSHIBA, T., KAMIYA, Y., SEO, M. Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2012.

KAR, M. & MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315- 319, 1976.

KAVATI, R. **Porta-enxertos em anônáceas**. In: FERREIRA, G., KAVATI, R., BOARO, C. S. F., FERRARI, T. B., LEONEL, S. Anônáceas: Propagação e produção de mudas. Editora FEPAF, 2013.

KUNDU, M., SEET, R. Effect of maturation on seed quality in *Holoptelia integrifolia*. **Seed Sci. & Technol.**, v.39, p.402-411, 2011.

LABOURIAU, L.G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *S. hispanica* L. 1. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.59, n.1, p.37-56, 1987.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria – Geral da OEA, Série Biologia, Monografia 24, 1983.

LULSDORF, M.M.; YUAN, H.Y.; SLATER, A.M.H.; VANDENBERG, A. Endogenous hormone profiles during early seed development of *C. arietinum* and *C. anatolicum*. **Plant Growth Regul.**, v.71, p.191–198, 2013.

MA, L.; ZHANG, H.; XU, W.; HE, X.; YANG, L.; LUO, Y.; HUANG, K. Simultaneous Determination of 15 Plant Growth Regulators in Bean Sprout and Tomato with Liquid Chromatography–Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. **Food Anal. Methods**, v.6, p.941–951, 2013.

MAZIA, D.; BREWER, P.A.; ALFERT, M. The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromophenol blue. **Biological Bulletin**, v.104, p.57-67, 1953.

MELLO, J.I.O., BARBEDO, C.J., SALATINO, A. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n.53, p.889-899, 2010.

PAMMENTER N.W., BERJAK P. Evolutionary and ecological aspects of recalcitrant seed biology. **Seed Science Research**, v.10, p.301–306, 2000.

R. PAMPLONA. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1777, p.1249–1262, 2008.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **C. R. Biologies**, n.331, p.796–805, 2008.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499-514, 1973.

ROSA, S.D.V.F. da; PINHO, E.R.V.; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.

SASS JE. 1951. Botanical microtechnique. Iowa: State University Press, 228p.  
SILVA, J.B.; NAKAGAWA, J. Estudos de fórmulas para cálculo de velocidade de germinação. **Informativo Abrates**, v.5, p.62-73, 1995.

SINGH, D.P.; FILARDO, F.F.; STOREY, R.; JERMAKOW, A.M.; YAMAJUCHI, S.; SWAIN, S.M. Overexpression of a gibberellin inactivation gene alters seed development, KNOX gene expression, and plant development in Arabidopsis. **Physiol Plant**, v.138, p.74–90, 2010.

WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12 (Edição especial):p.7-21, 2000.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, v.11, p.135-148, 2001.

WEBER, H.; BORISJUK, L.; WOBUS, U. Molecular Physiology of Legume Seed Development. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.56, p.253–279, 2005.

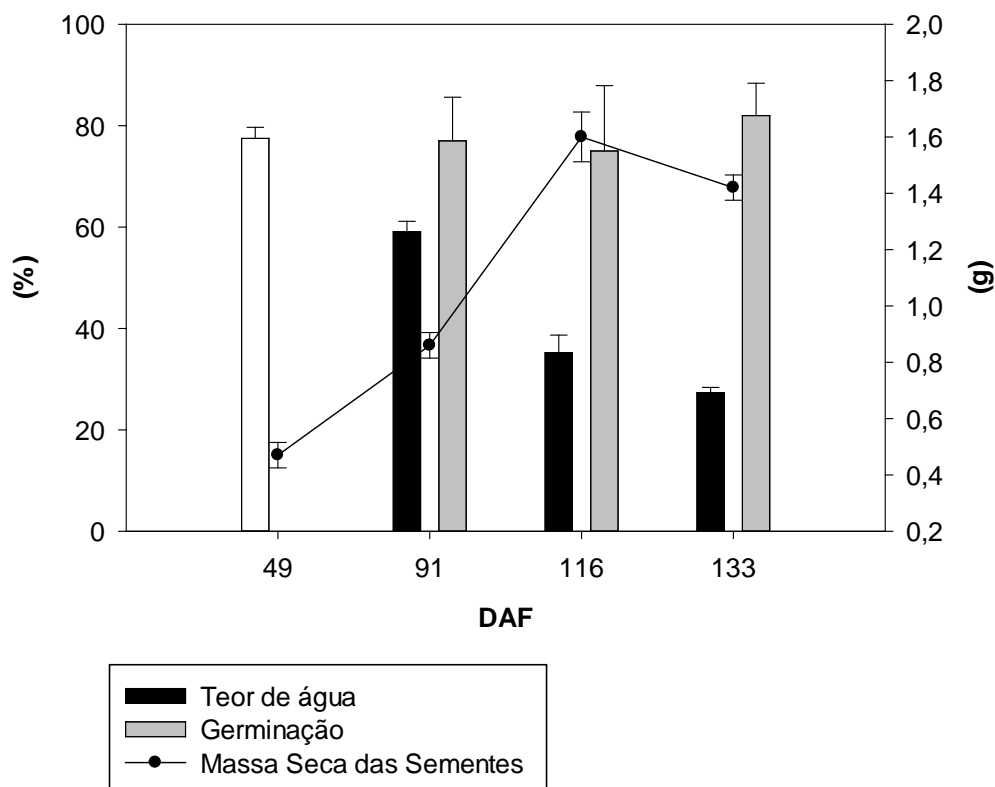
ZHAO, Y. Auxin Biosynthesis and Its Role in Plant Development. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.61, p.49–64, 2010.



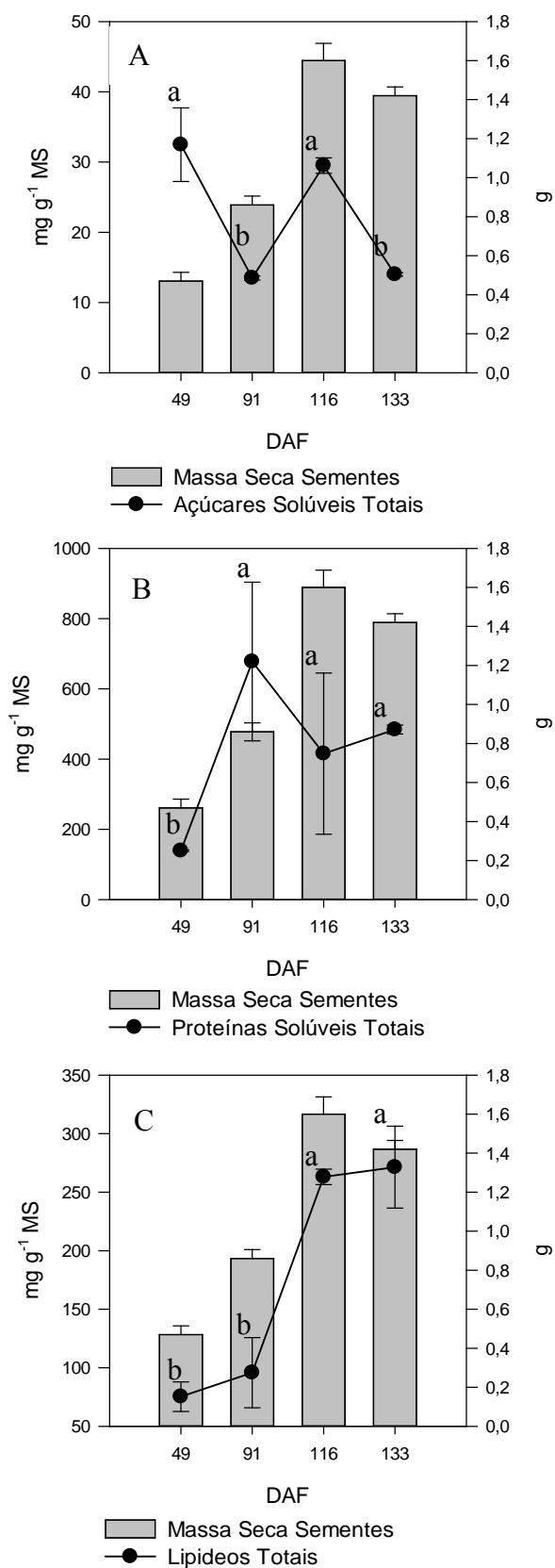
**Tabela 1:** Massa (mg), diâmetro (mm), comprimento (mm), pH, sólidos solúveis totais (°Brix) e massa seca das sementes (mg) dos frutos de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração), ciclo 2010/2011 e 2011/2012.

Dias Após Floração (DAF)	Massa (mg)	Diâmetro (mm)	Comprimento (mm)	pH	Sólidos Solúveis (°Brix)	Massa seca Sementes (mg)
Ciclo 2010/2011						
49	227,95 c	36,75 c	31,97 b	5,49 a	4,71 c	0,47 b
91	344,47 b	41,76 b	36,04 a	5,88 a	8,08 b	0,86 b
116	487,02 a	45,37 a	38,62 a	4,47 b	11,04 a	1,60 a
133	367,48 b	39,94 b	36,97 a	4,48 b	9,89 ab	1,42 a
C.V (%)	14,05	5,49	7,11	5,72	26,57	5,30
Ciclo 2011/2012						
49	237,95 c	33,75 c	30,97 b	5,40 a	4,71 c	0,37 b
91	340,47 b	41,76 b	34,04 a	5,80 a	8,00 b	0,76 b
116	467,02 a	46,37 a	35,62 a	4,42 b	11,05 a	1,50 a
133	327,48 b	32,94 b	36,97 a	4,43 b	9,79 ab	1,32 a
C.V (%)	14,05	5,49	7,11	5,72	26,57	5,30

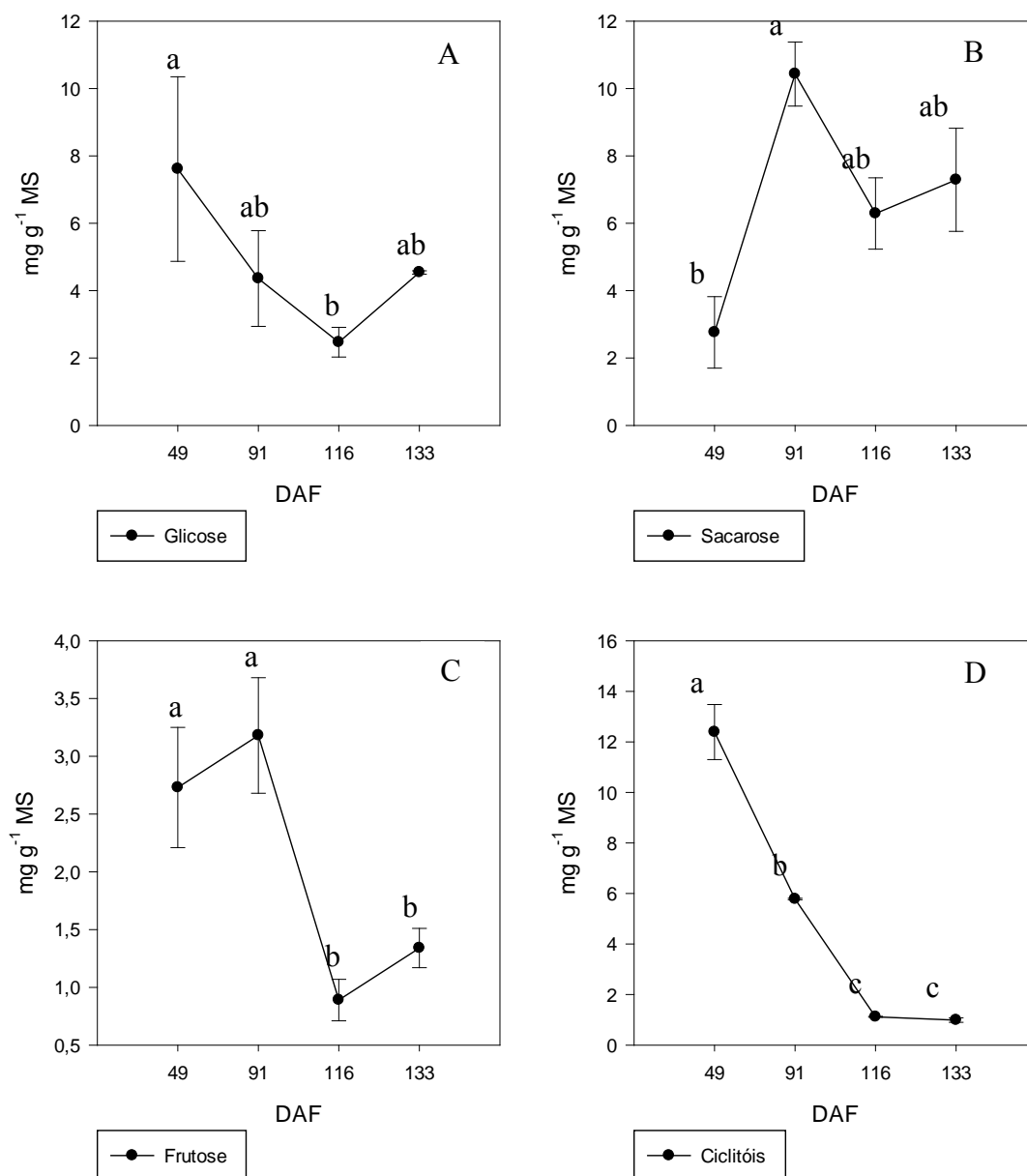
Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



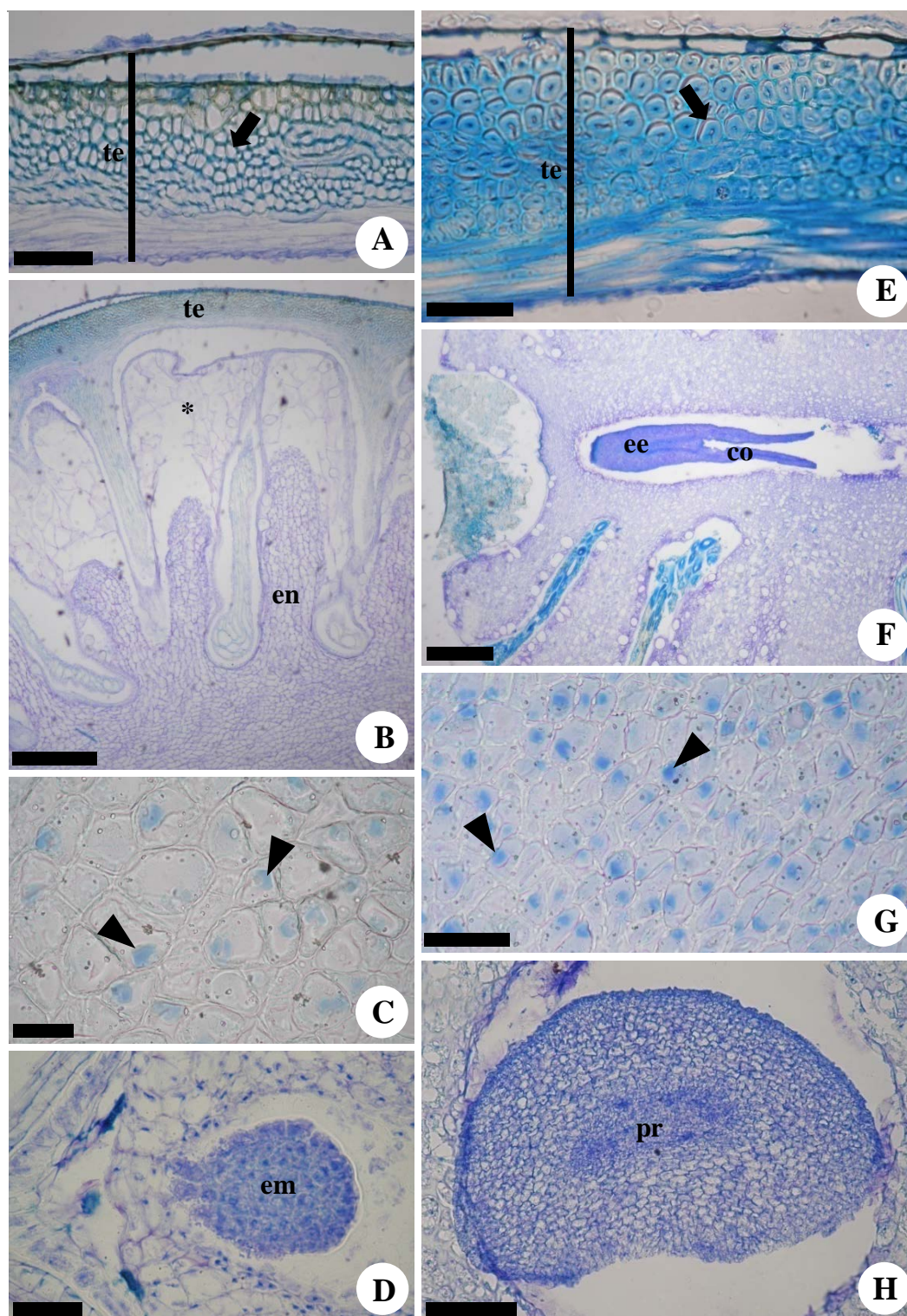
**Figura 1:** Teor de água (%), germinação (%) e massa seca das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração).



**Figura 2:** Acúmulo de massa seca (g), A: conteúdo de açúcares solúveis totais (mg g<sup>-1</sup> MS), B: proteínas solúveis totais (mg g<sup>-1</sup> MS) e C: lipídeos totais (mg g<sup>-1</sup> MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração).



**Figura 3:** Perfil de açúcares solúveis (mg g<sup>-1</sup> MS) A: glicose, B: sacarose, C: frutose e D: ciclitóis, das sementes *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração).

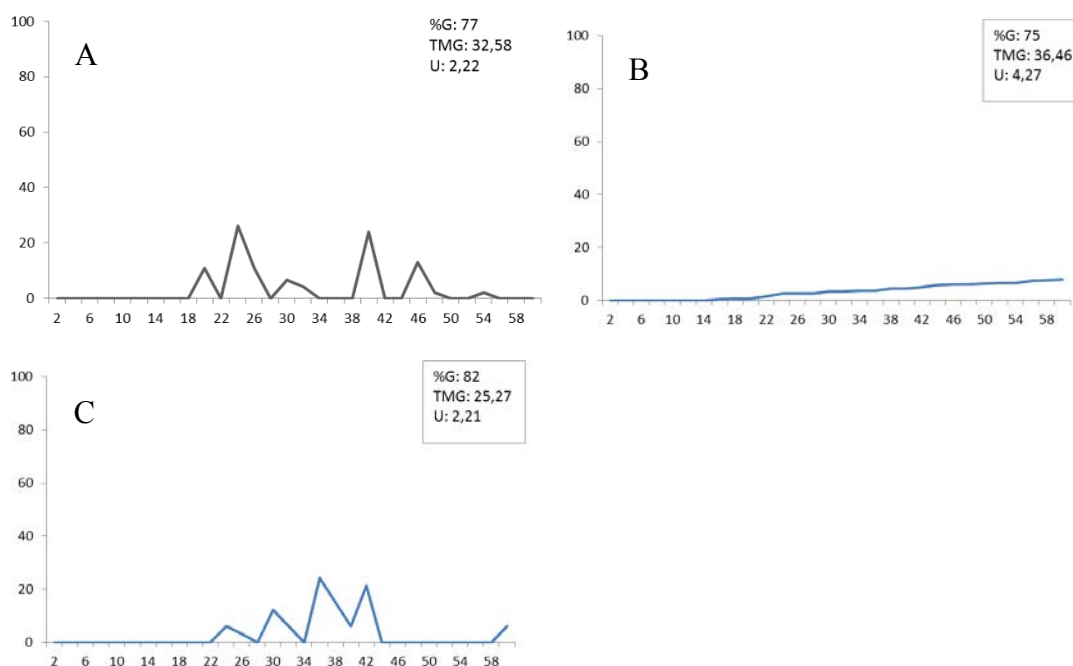


**Figura 4:** Semente de *Annona emarginata*. Secções transversais (A-C, E, G-H). Secções longitudinais (D, F). A-D. 49 DAF (dias após a floração). A. Tegumento seminal. B. Tegumento seminal e endosperma (\*: endosperma em celularização). C. Detalhe do endosperma, submetido ao teste histoquímico com Azul Mercúrio de Bromofenol. D. Embrião. E-H. 91 DAF (dias após a floração). E. Tegumento seminal. F. Endosperma e embrião. G. Detalhe do endosperma, submetido ao teste histoquímico com Azul Mercúrio de Bromofenol. H. Detalhe do embrião. Barra de escala=50 $\mu$ m (C, D, E), 100 $\mu$ m (A, G, H), 150 $\mu$ m (F), 500 $\mu$ m (B). (seta: espessamento da parede celular das células do tegumento; ponta de seta: acúmulo de proteína; co: cotilédone; ee: eixo embrionário; em: embrião; en: endosperma; pr: procâmbio; te: tegumento seminal).

**Tabela 2:** Germinação (%), tempo médio de germinação [TMG (dias)], índice de velocidade (IVG) e sincronização (U) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração).

Dias Após Floração (DAF)	G (%)	TMG (dias)	IVG	U
49	0 b	0,00 c	0,00 b	0,00 c
91	77 a	32,58 a	16,70 a	2,22 b
116	75 a	36,46 a	9,93 ab	4,28 a
133	82 a	25,27 b	7,69 ab	2,21 b
C.V (%)	14,38	10,56	64,46	14,52

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

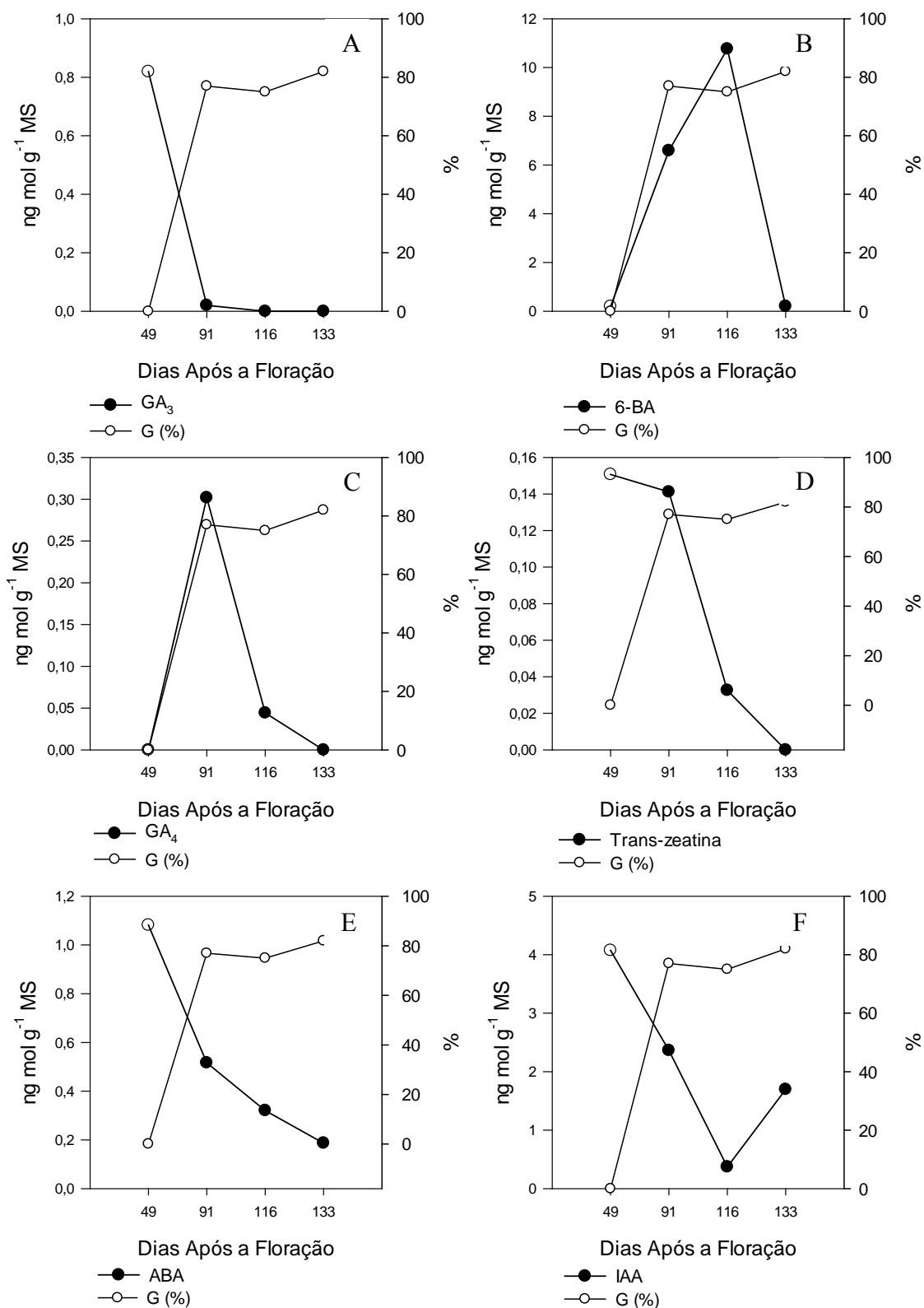


**Figura 5:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer) ao longo do desenvolvimento das sementes. A: 91 DAF, B: 116 DAF e C: 133 DAF (dias após a floração).

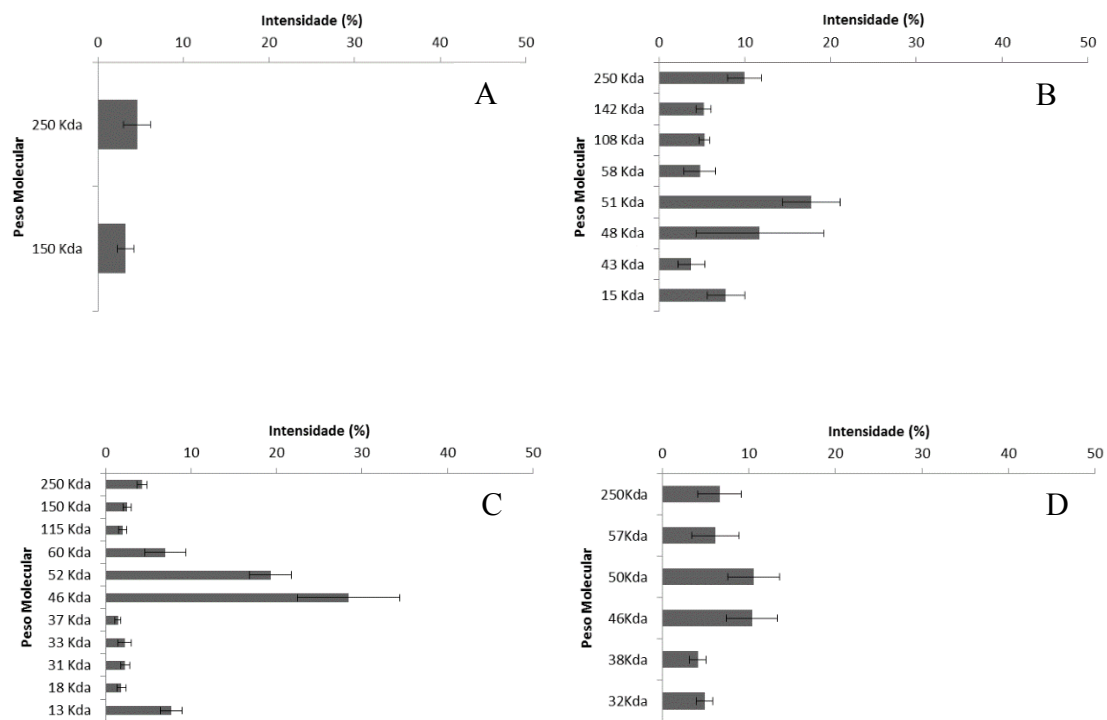
**Tabela 3:** Atividade específica da peroxidase [POD ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )], superóxido dismutase [SOD ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )] e teores de lipoperóxido ( $\text{nmol MDA}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{MS}$ ) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração).

Dias Após Floração (DAF)	POD ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	SOD ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	Lipoperóxido ( $\text{nmol MDA}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{MS}$ )
49	0,010 a	0,372 a	5,056 b
91	0,003 b	0,144 a	3,838 b
116	0,002 b	0,204 a	5,563 b
133	0,002 b	0,167 a	9,930 a
C.V (%)	29,61	43,11	17,67

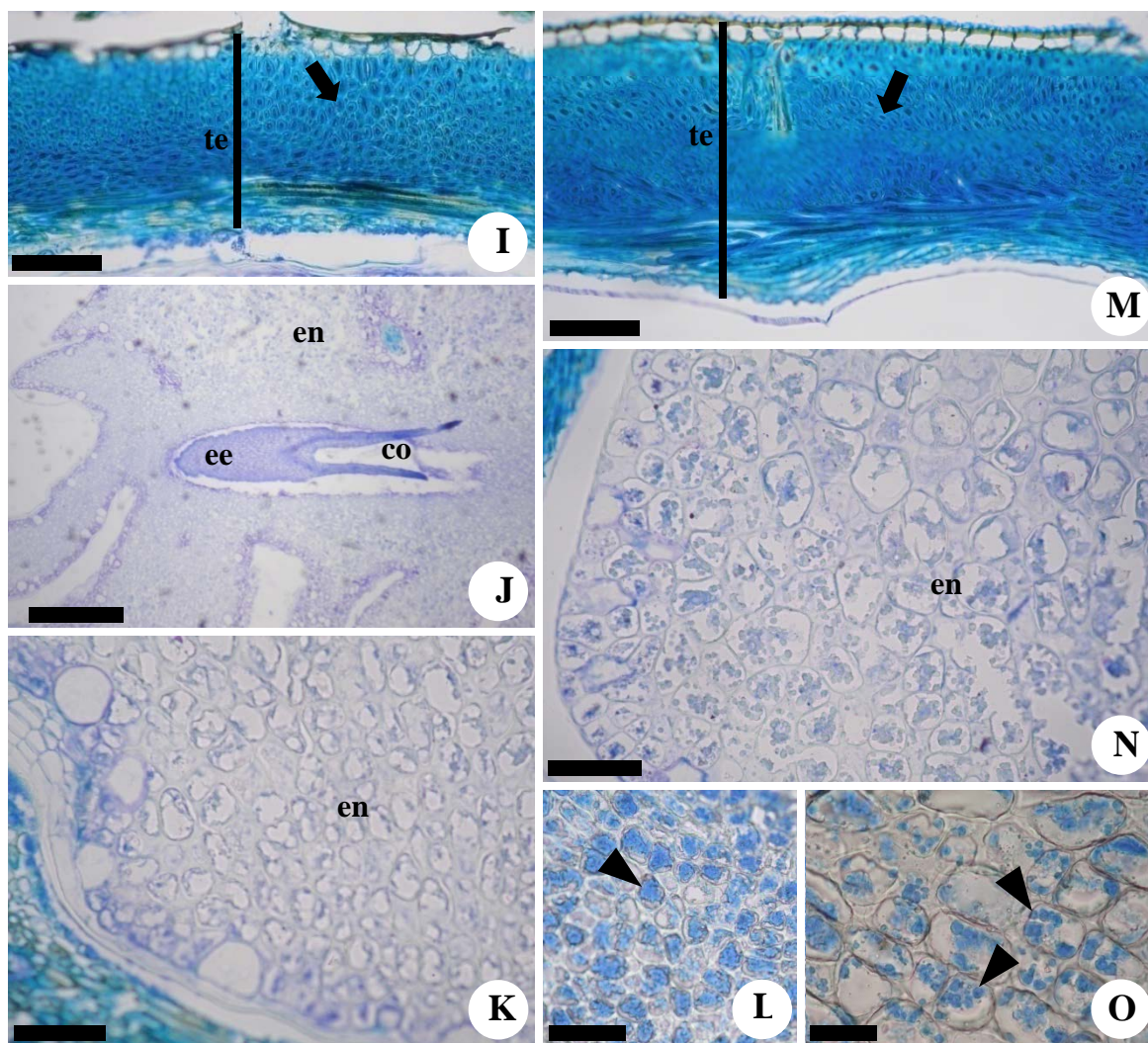
Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



**Figura 6:** Perfil Hormonal (ng g<sup>-1</sup> MS) e germinação (%) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. A: GA<sub>3</sub>, B: 6-BA, C: GA<sub>4</sub>, D: trans-zeatina, E: ABA, F: IAA aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração).



**Figura 7:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer. A: 49 DAF (dias após a floração), B: 91 DAF, C: 116 DAF e D: 133 DAF com água inicial. Barras de desvio padrão comparando os diferentes pesos moleculares.



**Figura 8:** Semente de *Annona emarginata*. Secções transversais (I, K-O). Secção longitudinal (J). I-L. 116 DAF (dias após a floração). I. Tegumento seminal. J. Endosperma e embrião. K. Detalhe do endosperma, mostrando células com citoplasma denso. L. Detalhe do endosperma, submetido ao teste histoquímico com Azul Mercúrio de Bromofenol. M-O. 133 DAF (dias após a floração). M. Tegumento seminal. N. Detalhe do endosperma, mostrando células com citoplasma denso. O. Detalhe do endosperma, submetido ao teste histoquímico com Azul Mercúrio de Bromofenol. Barra de escala=50 $\mu$ m (O), 100 $\mu$ m (I, K, L, M, N), 500 $\mu$ m (J). (seta: espessamento da parede celular das células do tegumento; ponta de seta: acúmulo de proteína; co: cotilédone; ee: eixo embrionário; em: embrião; te: tegumento seminal).



## 5. CAPÍTULO 2

### SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER TOLERAM À DESSECAÇÃO?<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Artigo nas normas do periódico: Journal of Experimental Botany.

## SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER TOLERAM À DESSECAÇÃO?

Jaqueline Malagutti Corsato<sup>1\*</sup>; Gisela Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UNESP, Caixa Postal 510, Botucatu, CEP: 18608-970, São Paulo, Brasil. e-mail [gisela.unesp@yahoo.com.br](mailto:gisela.unesp@yahoo.com.br)

\*Autor para correspondência. e-mail [jaque\\_corsato@hotmail.com](mailto:jaque_corsato@hotmail.com), Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Caixa Postal 510, Botucatu, CEP: 18608-970, São Paulo, Brasil

**Resumo:** A classificação quanto à sensibilidade das sementes à secagem está dividida entre sementes tolerantes e intolerantes ao processo. A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum-de-terra-fria) é amplamente usada como portaenxerto para atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.) e sugere-se que a semeadura dessa espécie seja realizada logo após a extração das sementes, indicando que essas não toleram a secagem. O objetivo do trabalho foi avaliar se as sementes de *A. emarginata* toleram à dessecação e quais os mecanismos envolvidos no processo. O experimento foi realizado com delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo 5 teores de água x 4 épocas de armazenamento. Foram realizadas coletas aos 49, 91, 116 e 133 DAF e as sementes provenientes desses diferentes estádios de maturação foram submetidas à secagem em estufa à 32°C até 20, 15, 10 e 5% de água. Após a secagem em cada época de coleta as sementes passaram por análises bioquímicas (açúcares solúveis totais; proteínas LEA; atividade da peroxidase; atividade da superóxido dismutase; teores de lipoperóxido, quantificação hormonal). Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5%. As sementes com 91 DAF apresentam elevada porcentagem de germinação (77%) no entanto não toleram secagens que reduzam o teor de água a 10 e 5%. Essa tolerância é verificada aos 116 DAF e se mantêm até a dispersão (133 DAF). Concluimos que as sementes de *A. emarginata* toleram a dessecação à partir dos 116 dias após a floração.

**Palavras-chave:** araticum-de-terra-fria, proteção à membranas, açúcares solúveis, proteínas LEA, sistemas antioxidantes, níveis hormonais.

## **Introdução**

As sementes correspondem à um complexo método de reprodução sexuada presentes em plantas vasculares (Linkies et al., 2010). O estudo do controle das alterações fisiológicas que ocorrem ao longo do desenvolvimento, secagem e armazenamento das sementes, são importantes tanto para manter a germinação ao longo do tempo quanto para a preservação das espécies em bancos de germoplasma (Barbedo et al. 2002; Barbedo et al. 2013).

A base da classificação quanto à sensibilidade das sementes à secagem e ao armazenamento foi proposta inicialmente por Roberts (1973) e está dividida entre sementes tolerantes e intolerantes ao processo. Quando as sementes apresentam tolerância à dessecação são denominadas como ortodoxas, e estas são as sementes que na fase final da maturação passam por uma secagem pré-programada e provavelmente dependem desse processo para redirecionar seu metabolismo, tendo como finalidade a germinação (Black & Pitchard, 2002). Estas sementes quando secas reduzem seu metabolismo e permitem que sejam armazenadas a baixas temperaturas por um longo período até que as condições do meio sejam favoráveis a germinação (Kermode, 1990; Walters 2000; Samarah et al., 2010).

As sementes intolerantes por sua vez, não reduzem o conteúdo de água no final do seu desenvolvimento, sendo dispersas com elevados teores de água (acima de 40%), metabolismo ativo e completa capacidade de germinação, podendo germinar quando ainda estão ligadas à planta mãe (Berjak e Pammenter, 2008). Evolutivamente estas sementes encontram-se em ambientes de água abundante, não havendo a necessidade de interrupção no processo de estabelecimento de novas plantas (Barbedo et al., 2013).

Para que uma semente consiga tolerar a retirada de água durante a fase final do desenvolvimento (90% a 95%) são necessários alguns pré-requisitos, os quais envolvem mudanças na estrutura e reorganização celular (Pérez et al. 2012). Esta capacidade foi adquirida com o tempo e envolve complexos mecanismos, dentre eles destaca-se a presença de proteínas da embriogênese tardia (LEA), açúcares solúveis e um sistema antioxidante eficiente, sendo que todos estes mecanismos agem conjuntamente na proteção dos componentes celulares durante a perda de água (Walters, 2000; Moore et al., 2009).

As proteínas LEA e os açúcares solúveis (sacarose, rafinose e estaquiose), apresentam característica hidrofílica e durante a perda de água pela semente agem como moléculas osmoprotetoras, evitando que ocorram danos à membrana durante a

embebição (Pammenter e Berjak, 2000; Uemura & Steponkus, 2003; Leduc et al., 2012).

A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer pertence à família Annonaceae, é popularmente conhecida como araticum-de-terra-fria e é nativa do território brasileiro. A planta comporta-se bem em solos secos e têm resistência a solos úmidos (Tokunaga, 2000; Rainer, 2007). A importância desta espécie está relacionada com sua rusticidade, o que justifica seu uso em programas de melhoramento genético e como portaenxerto para espécies da família Annonaceae. Quando utilizada como portaenxerto para atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.) e cherimóia (*Annona cherimola* Mill.), proporciona maior compatibilidade entre enxerto e portaenxerto, vigor à copa e resistência aos fungos, à podridão de raízes e às brocas que atacam o colo das plantas (Kavati, 2013; Bonaventure, 1999; Tokunaga, 2000).

Há evidências de que *A. emarginata* possam ser secas até 12% de água, e a sacarose parece ser o açúcar mais relacionado à tolerância à dessecação apresentada (Corsato et al., 2012). No entanto, não estão claros os mecanismos de tolerância à dessecação envolvidos e nem o momento durante o desenvolvimento no qual a tolerância é adquirida.

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar se as sementes de *A. emarginata* toleram à dessecação e quais os mecanismos envolvido no processo.

### **Material e Métodos**

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Fisiologia da Germinação e Dormência de Sementes do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, *campus* de Botucatu – SP.

Durante o período de floração das plantas de araticum-de-terra-fria (outubro de 2010 e outubro de 2011), foram marcadas matrizes no Núcleo de Produção de Mudas da CATI, localizado em São Bento do Sapucaí – SP (22° 41'20" sul e a uma longitude 45° 43' 51" oeste, altitude de 886 metros). Foram determinadas cinco épocas de coleta: 49, 91, 116 e 133DAF (dias após a floração), as quais abrangeram o desenvolvimento, até a dispersão das sementes.

A determinação do teor de água inicial das sementes de *A. emarginata* provenientes de cada época de coleta foi realizada utilizando quatro repetições de 25 sementes por parcela. As sementes foram acondicionadas em estufa de secagem com circulação forçada de ar à temperatura de 103°C durante 17 horas (Ista, 2004). Os

resultados do teor de água das sementes foram expressos em porcentagem (%), com base no peso úmido das sementes conforme a metodologia descrita pela Ista (2004).

As sementes foram submetidas à teste de germinação em esquema fatorial 4x5 (épocas de desenvolvimento x níveis de secagem), totalizando 20 tratamentos com quatro repetições de 15 sementes por parcela. As sementes provenientes de cada época de coleta (49, 91, 116 e 133 DAF) do desenvolvimento e apresentando teor de água inicial e reduzido para 20%, 15%, 10% e 5% em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 32°C, foram colocadas para germinar em papel Germitest umedecido com água destilada na proporção de duas vezes e meia o peso do papel seco (Brasil, 2009), em câmara de germinação com temperatura e fotoperíodo alternados, 20°C durante 18 horas de escuro e 30°C por seis horas de claro (Costa, 2009).

As avaliações foram constituídas de contagem do número de sementes germinadas a cada dois dias, sendo considerado como germinada aquela que apresentou pelo menos 2 mm de raiz primária (Hadas, 1976). Foram calculadas as porcentagens, tempo médio (Edmond e Drapala, 1958), índice de velocidade (Silva e Nakagawa, 1995), frequência e sincronização da germinação (Laboriau e Agudo, 1987) e a porcentagem de plântulas normais (Brasil, 2009).

Para as análises bioquímicas o delineamento foi em esquema fatorial 4x5 (épocas de desenvolvimento x níveis de secagem). Foram coletadas três repetições de 10 sementes por parcela, as quais foram previamente maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer à temperatura de -80°C até o momento das análises descritas à seguir.

### **Açúcares solúveis**

Para a extração dos açúcares solúveis foram utilizados 100mg de semente inteira macerada, foi acondicionada em tubos eppendorf, onde foi adicionado 1 mL de etanol 80% na proporção de 10:1. Os tubos foram incubados em banho a 80°C por 15 minutos (Dubois et al., 1956). Após incubação, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para tubos com capacidade de 5 mL. O mesmo procedimento foi repetido duas vezes com o substrato restante e o volume final do extrato foi ajustado para 3mL. A união dos três sobrenadantes resultou no extrato com a fração de açúcares solúveis que foi analisada.

Após a extração do material foi realizada a determinação dos açúcares solúveis totais pelo método do fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956). Para a purificação das

amostras foi utilizado 1ml de amostra, a qual passou em resina catiônica e aniônica. O pH das amostras foi corrigido com hidróxido de amônio e ácido clorídrico e, posteriormente, estas foram armazenadas em freezer (Garcia et al., 2006). As amostras foram liofilizadas e suspensas em 1ml de água deionizada. As amostras foram aplicadas na coluna de dosagem CARBO PAC1 (2 x 250 mm) e, então, determinado o perfil de açúcares solúveis das amostras (Garcia et al., 2006).

### **Proteínas LEA**

Para a extração de proteínas LEA foi seguida a metodologia descrita por Rosa et al. (2005). As sementes inteiras foram maceradas em tampão de extração 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 500 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 mM do inibidor de protease PMSF na proporção de 1:10 (peso do material: volume do tampão). O material foi centrifugado a 12000 rpm à 4°C por 45 minutos e o sobrenadante incubado em banho Maria a 85°C por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante resultou na fração de proteínas LEA.

80 µL de tampão da amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46g SDS, 20mg de azul de bromofenol, Tris-HCl pH = 7,5) foram adicionados em 20 µL de cada extrato, seguido de uma incubação em banho-maria com água em ebulição por cinco minutos. Foram aplicados 10 µL de cada amostra em gel de poliacrilamida 12,5% (gel separador) e 4% (gel de empilhamento). A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical à temperatura ambiente e voltagem constante de 50V por cinco horas. Após a corrida, os géis foram corados em solução de Comassie Brilliant Blue a 0,05% por 24 horas e descoradas com solução de etanol a 5%, ácido acético 10% e água 85%, conforme Alfenas (1988).

Os géis foram salvos e suas imagens digitalizadas através do Image Master VDS e software analisador de imagens do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP, *campus de Botucatu* - SP. O programa foi utilizado para determinar o IOD (intensidade de densidade óptica de cada banda proteica) e os resultados foram expressos em intensidade de bandas.

### **Lipídeos Totais**

A quantidade de lipídeos presente nas sementes de *A. emarginata* foi obtida pela extração com hexano em um aparelho extrator Soxhlet por 8 horas (método descrito pela AOCS Bc 3-49 (AOCS, 1993)). Para 1 grama de semente inteira macerada, 130 ml

do solvente foram utilizados. Após a extração, o solvente foi evaporado através de um rotavapor. O método foi repetido mais três vezes e a fração de lipídeos totais determinada pela massa de lipídeos gerada.

### **Proteínas solúveis totais**

Para a extração das proteínas solúveis totais foi seguida a metodologia de Kar e Mishra (1976). Foram utilizados 600 mg de sementes inteiras, as quais foram trituradas em nitrogênio líquido homogeneizadas com a auxílio de um almofariz em 5mL de tampão de extração fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8. O macerado centrifugado à 12000 rpm por 40 minutos. A determinação das proteínas solúveis totais foi realizada pelo método de Bradford (1976).

### **Atividade da enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)**

A atividade da peroxidase foi determinada de acordo com as condições citadas no trabalho de Teisseire e Guy (2000). O sistema de reação foi composto de 100 uL de extrato enzimático diluído no tampão de extração; tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,5; pirogalol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol.L<sup>-1</sup> e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 5 mmol L<sup>-1</sup>. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 5 minutos e resulta na formação de purpurugalina, a qual foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430nm e seu coeficiente de extinção molar (2,47 mmol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em umol de purpurugalina min<sup>-1</sup> de proteína.

### **Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi realizada pelo método de Beauchamp e Fridovich (1971), citados por Bor et al. (2003). O sistema de reação é foi composto de 30µL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,8, mistura “nitrobluetetrazolium” (NBT) 33 µmol L<sup>-1</sup> + EDTA 0,66 mmol L<sup>-1</sup> (5:4) e mistura L-metionina 10 mmol L<sup>-1</sup> + riboflavina 3,3 mol L<sup>-1</sup> (1:1), totalizando um volume de 3,0mL. Após iluminação dos tubos por 5 minutos a 25°C, a redução do NBT a “blue formazan” foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 560 nm. A atividade da SOD foi expressa em U mg<sup>-1</sup> de proteína.

### **Teores de lipoperóxido**

Os níveis de peroxidação de lipídeos foram avaliados utilizando a metodologia de Heath e Packer (1968). Para isso, foram utilizados 100 mg de sementes inteiras as quais foram maceradas em almofariz adicionando-se 2ml de um meio de reação constituído por ácido tiobarbitúrico (0,25%, m/v) e ácido tricloro acético (10%, m/v). A solução foi acondicionada em tubos de ensaio vedados e incubados em banho-maria a 95°C por 1 hora. A solução resultante foi centrifugada a 12000 rpm por 40 minutos a 25°C. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda 532 e 600nm. O montante de malondialdeído (MDA) formado foi calculado utilizando um coeficiente de extinção de  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **Hormônios**

Para a extração e quantificação dos hormônios (ABA, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, IAA, 6-BA, trans-zeatina e IBA) foi adaptada a metodologia de Ma et al., 2013. Foram utilizados 100mg de material acondicionado em tubos eppendorf, onde foi adicionado 1 mL da solução contendo: 40mL de metanol: 40mL de acetonitrila : 20mL de água Milli-Q : 1mL de ácido acético, na proporção de 10:1. Os tubos foram agitados em Vortex por 2 minutos, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para tubos com capacidade de 2mL. O mesmo procedimento foi repetido mais uma vez com o substrato restante e o volume final do extrato foi ajustado para 2mL. A união dos dois sobrenadantes resultou no extrato com a fração de hormônios que foi analisada por cromatografia de alta performance (HPLC).

A separação cromatográfica foi feita em um HPLC Shimadzu modelo Prominence composto dos seguintes módulos: Desgaseificador de fase móvel DGU-20A, sistema de bombeamento quaternário composto pelas bombas LC-20AD, autoamostrador modelo SIL-20ACHT, controlador CBM-20A e forno para colunas modelo CTO-20AC. Foi usada uma coluna Sinergi 2.5 um Hydro RP-100A 50x4.6mm. A coluna foi mantida a temperatura de 40°C durante as determinações. O efluente da coluna foi introduzido em um Espectrômetro de Massas do tipo Triploquadrupolo (MS/MS) marca AB Sciex modelo 4500 equipado com fonte de ionização tipo ESI (eletrospray) na interface.



## Resultados

Os dois ciclos estudados (outubro de 2010 e outubro de 2011) apresentaram o mesmo padrão de resposta, por esse motivo os resultados apresentados à seguir refere-se apenas ao ciclo referente à outubro de 2010 até fevereiro de 2011.

À medida em que os frutos foram se desenvolvendo, as sementes de *A. emarginata* foram reduzindo o teor de água e aumentando a massa seca até o momento da dispersão dos frutos aos 133 DAF. Observamos que após 49 dias do florescimento, as sementes apresentavam teor de água inicial de 77% e não haviam adquirido a capacidade para germinar (Tabela 1).

Aos 91 DAF o teor de água das sementes era de 59% e a germinação de 77%. Aos 116 DAF o teor de água era de 35% e aos 133 DAF de 27% e a porcentagem de germinação não foi alterada, mantendo-se em 75% e 82% respectivamente.

Com a secagem, as sementes aos 91 DAF permitem redução no teor de água até 15%, e as sementes aos 116 e 133 DAF permitem secagem até 5% de água, mantendo 70% de germinação (Tabela 1).

Apesar das sementes germinarem aos 91 DAF, a secagem realizada reduziu a porcentagem e o índice de velocidade de germinação. Enquanto que para as sementes aos 133 DAF a secagem não interfere na germinação e reduz o tempo médio necessário para que o processo ocorra, sendo possível obter plântulas em um menor espaço de tempo (Tabela 1). Porém em todas as épocas de coleta, quando as sementes foram secas, a sincronização da germinação foi reduzida, o que resultou em germinação espalhada ao longo do tempo, conforme verifica-se nos gráficos de frequência (Figuras 1, 2 e 3).

Verificamos que ao longo do desenvolvimento das sementes desta espécie, houve acúmulo de reservas (proteínas solúveis, açúcares solúveis e lipídeos) e que a secagem artificial até 5% de água, levou a uma redução no conteúdo de proteínas solúveis aos 91 DAF e redução de açúcares solúveis totais aos 49 DAF, enquanto o conteúdo de lipídeos não foi alterado (Tabela 2).

O perfil de açúcares solúveis totais demonstrou ausência de rafinose e estaquiose em todas as fases do desenvolvimento. Os níveis de ciclitóis e glicose reduzem, enquanto os níveis de sacarose aumentam até os 91 DAF e se estabilizam entre 116 e 133 DAF (Figuras 4, 5, 6 e 7).

Após a secagem artificial das sementes aos 49, 91, 116 e 133 DAF, observamos que a sacarose é mais elevada quando as sementes são secas até 20 e 15% de água, enquanto os níveis de glicose e frutose são reduzidos, o que demonstra a conversão

entre esses açúcares (Figuras, 4, 5, 6 e 7). Os níveis de ciclitóis apresentam tendência de redução após a secagem das sementes.

Em relação à presença de proteínas da embriogênese tardia (LEA), verificamos que, ao longo do desenvolvimento ocorreu um aumento no número de bandas e também na intensidade dessas proteínas até aos 116 DAF quando foi detectado a tolerância à dessecação nas sementes de *A. emarginata* (Figuras 8, 9 10 e 11).

Quanto maior o número de bandas de proteínas LEA nas sementes recém colhidas (teor de água inicial) (Figuras, 8, 9, 10 e 11 A), maior a capacidade dessas sementes permitirem a secagem, como verificado aos 116 DAF (Figura 10). Após esse período, as sementes são dispersas com um menor número de bandas (Figura 11) e com a secagem também há um aumento no número e na intensidade de bandas, mantendo a elevada porcentagem de germinação.

Não foram observadas variações na atividade das enzimas antioxidantes (POD e SOD) com a secagem das sementes. No entanto, são observadas variações nos teores de lipoperóxido durante o desenvolvimento, sendo que nas fases iniciais do desenvolvimento (49 DAF) os danos celulares são maiores (Tabela 3).

No início do desenvolvimento, a presença de GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, IAA e trans-zeatina estão relacionadas com a divisão celular das sementes, uma vez que essas ainda não estão completas (Figura 12). Nesta fase também verificamos que a concentração do ABA é elevada. A medida que as sementes atingem a tolerância à dessecação (116 DAF) o ABA é reduzido e observa-se a presença de GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> e as citocininas, trans-zeatina e 6-BA (Figura 12).

### **Discussão**

A redução natural no teor de água das sementes de *A. emarginata* ao longo do desenvolvimento e em especial na proximidade da dispersão, indica um preparo dessas sementes para as possíveis condições adversas no ambiente o que sugere que essas sementes sejam ortodoxas (Roberts, 1973; Walters, 2000). Além do que, essa redução natural do teor de água tem por objetivo, reduzir o metabolismo para que essas sementes sejam dispersas com dormência ou quiescência (Barbedo et al., 2013).

Apesar da redução no conteúdo de água, sementes aos 133 DAF são dispersas com 27% de água, o que é elevado se compararmos com sementes classificadas tradicionalmente como ortodoxas (soja, milho, feijão), que são dispersas com cerca de 12% de água. Ao mesmo tempo, o teor de água observado no momento da dispersão

também não se assemelha as sementes recalcitrantes, que são dispersas com teor de água ao redor de 70% (Roberts, 1973; Walters, 2013).

Além da capacidade natural em reduzir o teor de água até o momento da dispersão, para ser considerada tolerante a dessecação, há necessidade de que as sementes mantenham a sua capacidade germinativa depois de serem secas até reduzidos teores de água (5%) (Roberts, 1973). A capacidade dessas sementes em reduzir naturalmente o teor de água e/ou permitir secagem após a dispersão, está relacionada com complexos mecanismos (Hoekstra e Buitink, 2001) que envolvem o acúmulo de açúcares solúveis, proteínas da embriogênese tardia e sistemas antioxidantes, regulados direta ou indiretamente pelo balanço hormonal (Walters, 2000; Pammenter e Berjak, 2007).

A tolerância à dessecação das sementes de *A. emarginata* é verificada aos 116 DAF, momento em que as sementes podem ter o conteúdo de água reduzido até 5%, enquanto a germinação é mantida em 70%, não diferindo da testemunha (sementes com teor de água inicial 35%). Tal tolerância é mantida aos 133 DAF quando o fruto é disperso.

Dessa forma, parece padrão para a espécie a capacidade de tolerar reduções no teor de água até cerca de 10-5%, dependendo do estágio de desenvolvimento das sementes, uma vez que em experimento anterior foi observado a possibilidade de redução no teor de água das sementes de *A. emarginata* até 12%, com porcentagem de germinação de 57,5% (Corsato et al., 2012). Outra espécie que também suporta a retirada de água é a *Annona glabra* L., a qual apresenta comportamento típico de sementes ortodoxas, com 90% de germinação em teores de água reduzidos para 5% (Carvalho et al., 2001).

Os açúcares solúveis apresentaram papel importante na tolerância à dessecação das sementes de *A. emarginata*, uma vez que atuam como moléculas osmoprotetoras, podendo substituir a camada de hidratação das membranas quando estas são perdidas pela secagem, evitando assim danos estruturais (Blackman et al., 1992). Nesse caso, foram observados para as sementes de *A. emarginata* aumento nos níveis de sacarose até os 91 DAF e estes se estabilizam entre 116 e 133 DAF, assim como aos 49, 91, 116 e 133 DAF, observamos que a sacarose é o açúcar mais elevado quando as sementes são secas até 20 e 15% de água, indicando assim que esse açúcar está envolvido na tolerância à dessecação apresentada pela espécie.

Além da sacarose, os oligossacarídeos rafinose e estaquiase, são corriqueiramente relacionados com a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas (Leduc et al., 2012), porém, as sementes em estudo não apresentam esses açúcares em sua constituição e nem por isso deixaram de tolerar à secagem até 5% de água aos 116 e 133 DAF, indicando que a ausência desses açúcares não impede que as sementes tolerem à dessecação.

A tolerância à dessecação nas sementes de *A. emarginata* também pode ser relacionada à participação das proteínas LEA (Wise e Tunnacliffe, 2004; Moore et al., 2009). Um aspecto que chama a atenção nos resultados é que as sementes ao longo do desenvolvimento, ao apresentarem redução natural do teor de água, tiveram a quantidade de proteínas LEA aumentadas em número e intensidade de proteínas com pesos moleculares por volta de 60 à 25 KDa, sendo que o declínio da água nas sementes poderia levar a produção dessas proteínas (Hu et al., 2009), aspecto esse comprovado, uma vez que em todos os estádios de desenvolvimento a secagem artificial das sementes também levou à esse aumento das LEA (Figuras 9, 10 e 11).

Garnczarska et al. (2008), trabalhando com sementes de ervilha, demonstraram que proteínas de peso molecular de 35, 30 e 29 KDa foram identificadas a medida que as sementes se desenvolvem. Estas proteínas, segundo Gay et al. (2005), não apresentam atividade catalítica e, assim, assumem um papel de proteção às células a medida que estas vão perdendo água.

Porém a produção dessas proteínas nas sementes não é regulada apenas pela redução no conteúdo de água nas sementes. O ABA, hormônio vegetal presente ao longo de todo o desenvolvimento das sementes de *A. emarginata* (Figura 12), também está relacionado à regulação da síntese das proteínas da embriogênese tardia (Taiz e Zeiger, 2013).

Normalmente ao longo do desenvolvimento das sementes é comum verificar dois picos de ABA (Liu et al., 2010). O segundo pico de ABA está relacionado com a síntese e acúmulo de substâncias que permitem a semente reduzir água no final do desenvolvimento sem gerar danos ao sistema de membranas (sacarose, rafinose, estaquiase e proteínas LEA) (Rajjou et al., 2012; Finkelstein, 2013). Porém em sementes de *A. emarginata* observamos que o conteúdo de ABA é reduzido ao longo do desenvolvimento, mas mesmo sem um segundo pico de ABA, há acúmulo de proteínas LEA e sacarose. Assim, verificamos não houve a necessidade de um aumento no conteúdo de ABA para que as sementes adquirissem tolerância à dessecação aos 116

DAF, apenas o conteúdo presente nas sementes, associado à redução no conteúdo de água foi suficiente para desencadear o processo.

Um outro mecanismo relacionado a capacidade das sementes tolerarem a secagem é a capacidade dos sistemas antioxidantes eliminarem radicais livres gerados pelo metabolismo celular evitando danos às membranas (Pamplona, 2008). As proteínas e os lipídeos constituintes da membrana, de um modo geral, parecem ser os principais alvos para o ataque de radicais livres. Normalmente, os radicais livres são formados durante a respiração celular e eliminados por sistemas antioxidantes, que evitam que esses reajam com proteínas e lipídeos, gerando danos celulares (Pukacka et al., 2011).

Nas sementes de *A. emarginata*, as análises de sistemas antioxidantes demonstraram que a secagem não levou à aumentos na atividade das enzimas POD e SOD (Tabela 3), o que sugere ausência de estresse adicional durante a secagem, uma vez que o sistema antioxidante estava ativo exercendo sua função protetora em evitar danos ao sistema de membranas (Rajjou e Debeaujon, 2008), o que permitiu a manutenção da sua integridade aos 116 e 133 DAF até 5% de água e consequente germinação quando as sementes foram reidratadas (Tabela 1).

### Conclusão

A presença de sacarose e proteínas LEA comprovam que as sementes de *A. emarginata* são tolerantes à dessecação à partir dos 116 dias após a floração.

### Referência<sup>4</sup>

ALFENAS, A. C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 151-182.

BARBEDO, C.J.; BILIA, D. A. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da mata atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 431-439, dez. 2002.

BARBEDO, C.J.; CENTENO, D. da. C.; RIBEIRO, R. de. C.L.F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, v.40, n.4, p.583-593, 2013.

BEAUCHAMP C., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem.**, v.44, n.1, p.276-87, 1971.

---

<sup>4</sup> Referências nas normas da ABNT

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: Seed Recalcitrance in Perspective. **Annals of Botany**. p. 1-16, 2007.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Desiccation sensitivity of excised embryonic axes of selected amaryllid species. **Seed Science Research** (2008) 18, 1–11

BLACKMAN, S.A.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation Proteins and Sugars in Desiccation Tolerance of Developing Soybean Seeds. **Plant Physiology**, v.100, p.225-230, 1992.

BONAVENTURE, L. El cultivo de la chirimoya e de su híbrido atemoya em Brasil. In: **First International Symposium on Cherimoya**, Equador, 1999.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regra de Análise de Sementes**. Brasília: departamento de produção vegetal, 2009, 398p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

HOEKSTRA, F.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **TRENDS in Plant Science**, v.6, n.9, 2001.

CARVALHO, J.E.U de; NASCIMENTO, W.M.O do; MULLER, C.H. Tolerância de sementes de araticum-do-brejo (*Annona glabra* L.) ao dessecação e ao congelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.23, n.1, p.179-182, 2001.

CORSATO, J.M.; FERREIRA, G.; BARBEDO, C.J. Desiccation tolerance in seeds of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer and action of plant growth regulators on germination. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.4, n.24, p.253-260, 2012.

COSTA, P.N. **Reguladores vegetais, luz e temperatura na germinação de sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer)**. 2009. 78p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DUBOIS, M. GILLES, K. A. , HAMILTON, J. K. , REBERS, P. A. , SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EDMOND, J. B.; DRAPALLA, W. J. . The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.71, p.428-443, 1958.

FINKELSTEIN, R. Abscisic Acid Synthesis and Response. **The Arabidopsis Book**, The American Society of Plant Biologists, 2013.

GARCIA, I.S.; SOUZA, A.; BARBEDO, C.J.; DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of

*Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology** v.66, p.739-745, 2006.

GARNCZARSKA, M., ZALEWSKI, T., WOJTYLA, L. A comparative study of water distribution and dehydrin protein localization in maturing pea seeds. **Journal of plant Physiology**, v.165, p.1940,1946, 2008.

HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.125, p.189-98, 1968.

HADAS, A. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.27, 1976.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. In: ISTA. **International Rules for Seed Testing**. Bassersdorf: ISTA, 2004. p.5.1- 5.5; 5A.1- 5A.50.

LABOURIAU, L.G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *S.hispanica* L. 1. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.59, n.1, p.37-56, 1987.

LINKIES, A., GRAEBER, K., KNIGHT, C., LEUBRER-METZGER, G. The evolution of seeds. **New Phytologist**, v.186, p.817-831, 2010.

LEDUC, S.N.M.; SILVA, J.P.N.; GASPAR, M.; BARBEDO, C.J.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Non-structural carbohydrates of immature seeds of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) are involved in the induction of desiccation tolerance. **Australian Journal of Botany**, v.60, p.42-48, 2012.

MOORE, J.P., LE, N.T., BRANDT, W.F., DRIOUICH, A. & FARRANT, J.M. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v.14, p.110-117, 2009.

PAMPLONA, R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. **Biochimica et Biophysica Acta** 1777 (2008) 1249 – 1262.

PUKACKA, S.; WÓJKIEWICZ, E. Carbohydrate metabolism in Norway maple and sycamore seeds in relation to desiccation tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v.159, p.273-279, 2002.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.ST.-Hil. **Annals Naturhist. Mus. Wien**, v.108, p.191-205, 2007.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **C. R. Biologies**, n.331, p.796-805, 2008.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499-514, 1973.

ROSA, S.D.V.F. da; PINHO, E.R.V.; VIEIRA, E.S.N.; VEIGA, R.D.; VEIGA, A.D. Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 91-101, 2005.

SAMARAH, N.H., AL-MAHASNCH, M.M., GHOSHEH, H. Z., ALQUDAH, A.M. TURK, M. The influence of drying methods on the acquisition of seed desiccation tolerance and the maintenance of vigour in wheat (*Triticum durum*). **Seed Sci. & Technol.**, v. 38, p.193-208, 2010.

SILVA, J.B.; NAKAGAWA, J. Estudos de fórmulas para cálculo de velocidade de germinação. **Informativo Abrates**, v.5, p.62-73, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954p.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, Amsterdam, v. 153, p. 65-72, 2000.

TOKUNAGA, T. **A cultura da Atemóia**. Campinas: CATI, p. 80, 2000. (Boletim técnico, 233).

UEMURA, M.; STEPONKUS, P.L. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplast isolated from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**, v.26, p. 1083-1096, 2003.

WISE, M. J; TUNNACLIFFE A. POPP the question: what do LEA proteins do? **Trends In Plant Science**, V.9, N.1, 2004.

WALTERS, C. Levels of recalcitrance in seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12 (Edição especial):p.7-21, 2000.

WALTERS, C. BERJAK, P. PAMMENTER, N. KENNEDY, K. RAVEN, P. Preservation of Recalcitrant Seeds. **Science**. 339, 915 (2013).



**Tabela 1:** Germinação (%), tempo médio de germinação [TMG (dias)], índice de velocidade de germinação (IVG) e sincronização (U) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem à 32°C.

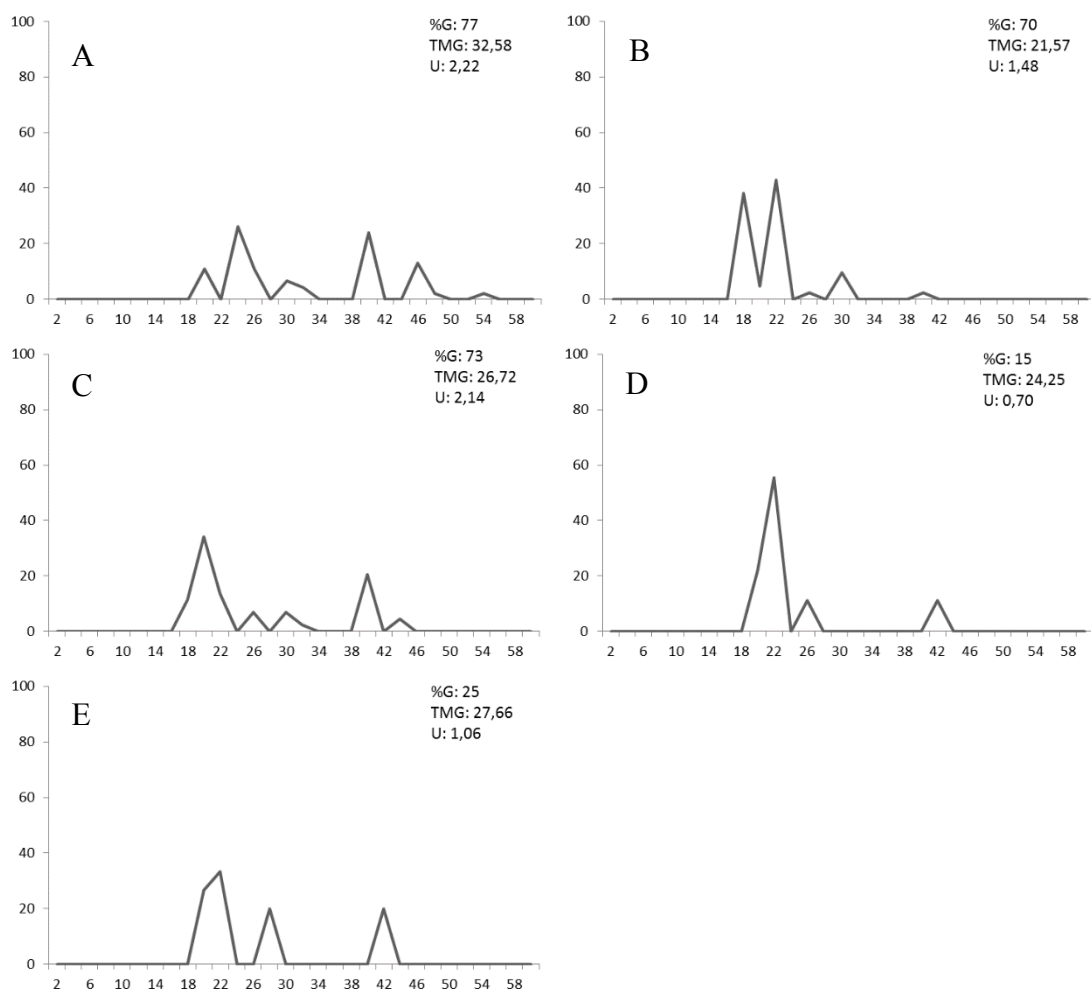
	49	91	116	133
G (%)				
Inicial	0 aB	77 aA	75 abA	82 aA
20%	0 aC	70 aAB	58 bB	88 aA
15%	0 aB	73 aA	80 aA	72 aA
10%	0 aC	15 bC	80 aA	50 bB
5%	0 aC	25 bB	70 abA	70 abA
C.V (%)	21,25			
TMG (dias)				
Inicial	0,00 aC	32,58 aAB	36,46 aA	25,27 aB
20%	0,00 aC	21,57 bB	35,85 aA	13,65 bcB
15%	0,00 aC	26,72 abAB	32,54 aA	18,67 abB
10%	0,00 aD	24,25 abB	34,92 aA	11,73 bcC
5%	0,00 aB	27,66 abA	31,04 aA	7,45 cB
C.V (%)	23,16			
IVG				
Inicial	0,00 aB	16,70 bcA	9,93 aAB	7,69 aAB
20%	0,00 aB	37,01 aA	9,88 aB	10,88 aB
15%	0,00 aB	21,95 bA	19,20 aA	4,64 aB
10%	0,00 aB	6,88 cAB	15,76 aA	2,65 aB
5%	0,00 aB	10,94 bcAB	19,78 aA	5,51 aB
C.V (%)	61,67			
U				
Inicial	0,00 aC	2,22 aB	4,28 aA	2,21 aB
20%	0,00 aC	1,49 abAB	1,95 bA	1,08 bB
15%	0,00 aC	2,14 aA	2,07 bA	0,93 bB
10%	0,00 aB	0,71 bB	2,20 bA	0,46 bB
5%	0,00 aC	1,06 bB	1,91 bA	0,48 bBC
C.V (%)	31,52			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

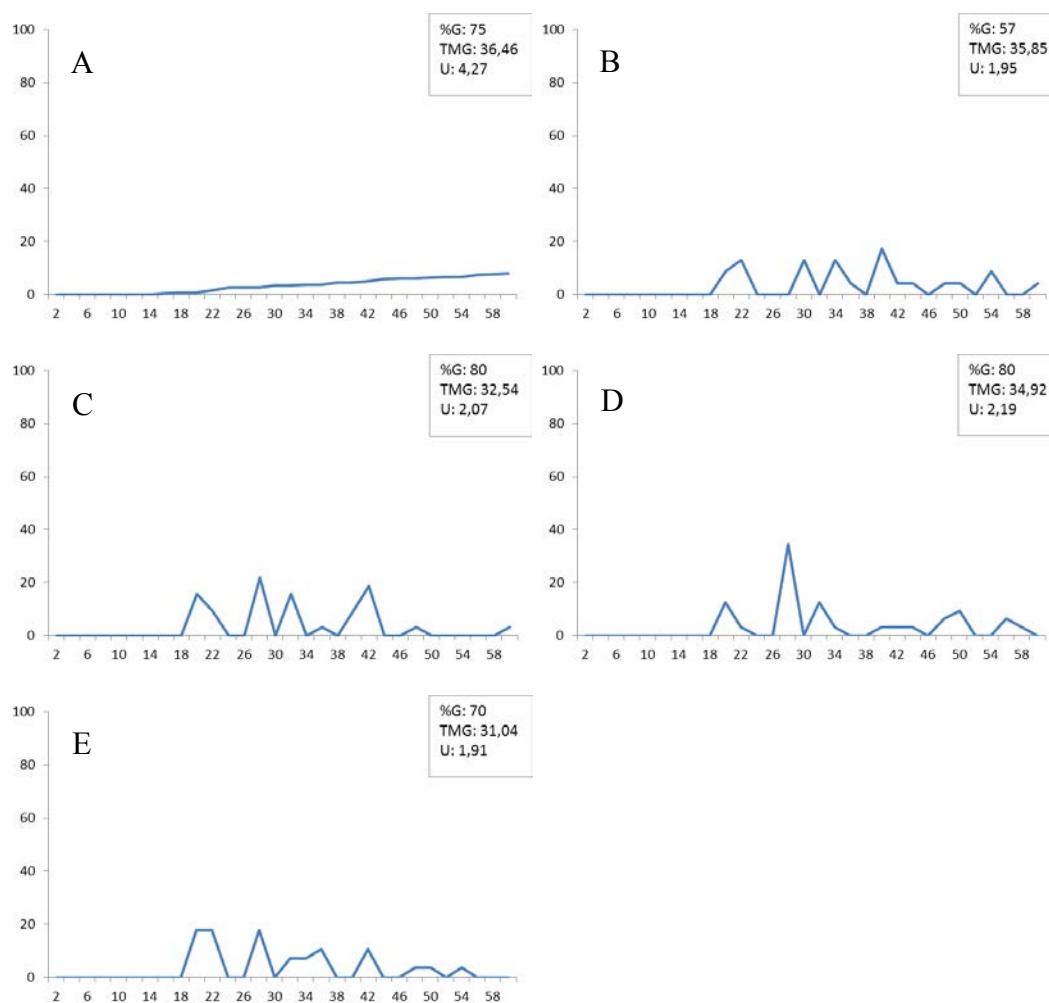
**Tabela 2:** Conteúdo de proteínas solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS), açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) e lipídeos totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem à  $32^{\circ}\text{C}$ .

	49	91	116	133
	<b>Proteína Solúvel Total (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>			
Inicial	139,025 aC	677,735 aA	415,461 aB	484,004 aAB
20%	58,303 aB	301,488 bA	364,046 aA	336,252 aA
15%	72,355 aB	313,926 bA	293,322 aAB	346,027 aA
10%	113,684 aB	388,459 bA	301,732 aAB	343,128 aAB
5%	117,633 aA	323,756 bA	298,003 aA	258,580 aA
C.V (%)	28,93			
	<b>Açúcares Solúveis Total (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>			
Inicial	44,607 aA	13,490 cC	29,493 aB	14,001 aC
20%	15,637 bcB	17,893 bcB	29,921 aA	18,521 aAB
15%	25,4455 bA	24,838 abcA	27,293 aA	16,359 aA
10%	21,725 bcBC	37,061 aA	29,397 aAB	12,061 aC
5%	11,954 cB	29,211 abA	18,554 aAB	14,091 aB
C.V (%)	18,98			
	<b>Lipídeos Totais (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>			
Inicial	75,313 aB	95,753 aB	263,094 aA	271,370 aA
20%	17,939 aB	98,702 aB	230,965 aA	266,810 aA
15%	25,186 aB	95,637 aB	239,701 aA	275,035 aA
10%	12,163 aC	146,439 aB	178,235 aAB	269,401 aA
5%	18,364 aB	104,477 aB	204,810 aA	293,088 aA
C.V (%)	22,24			

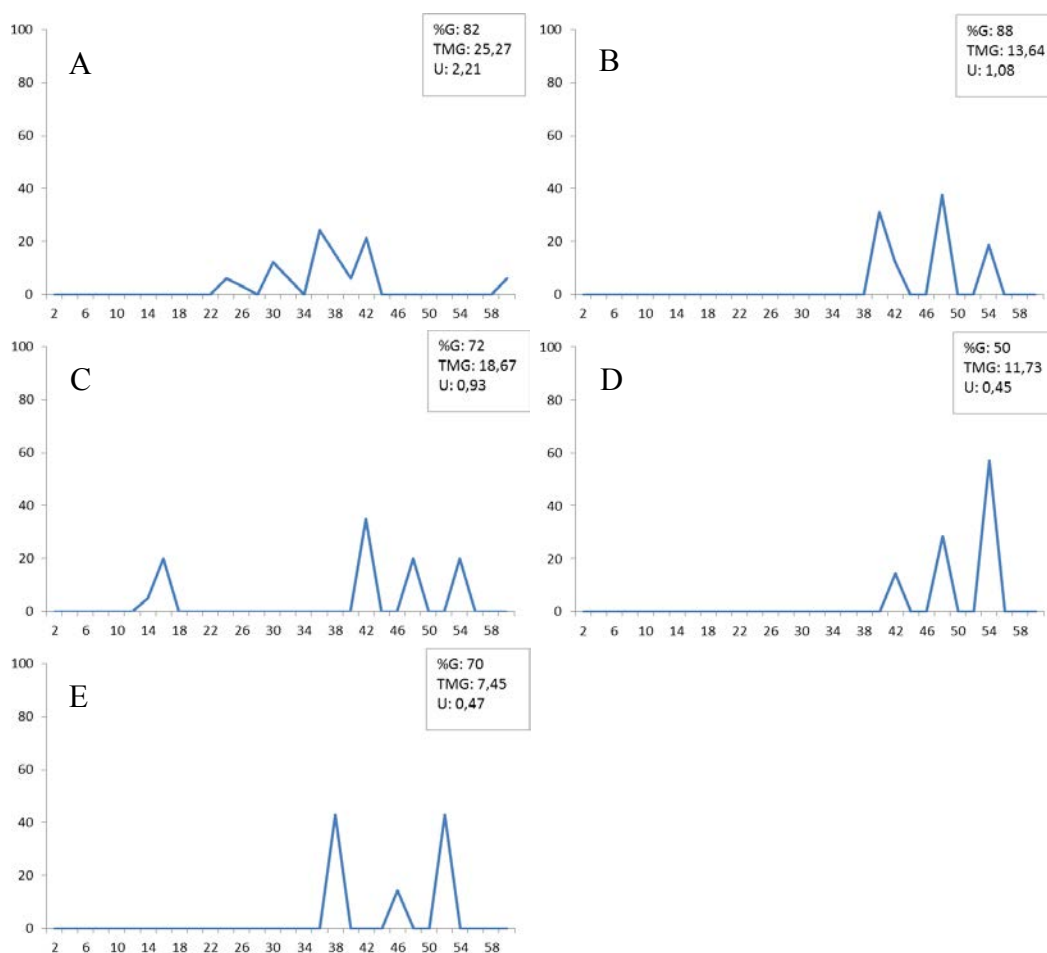
Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



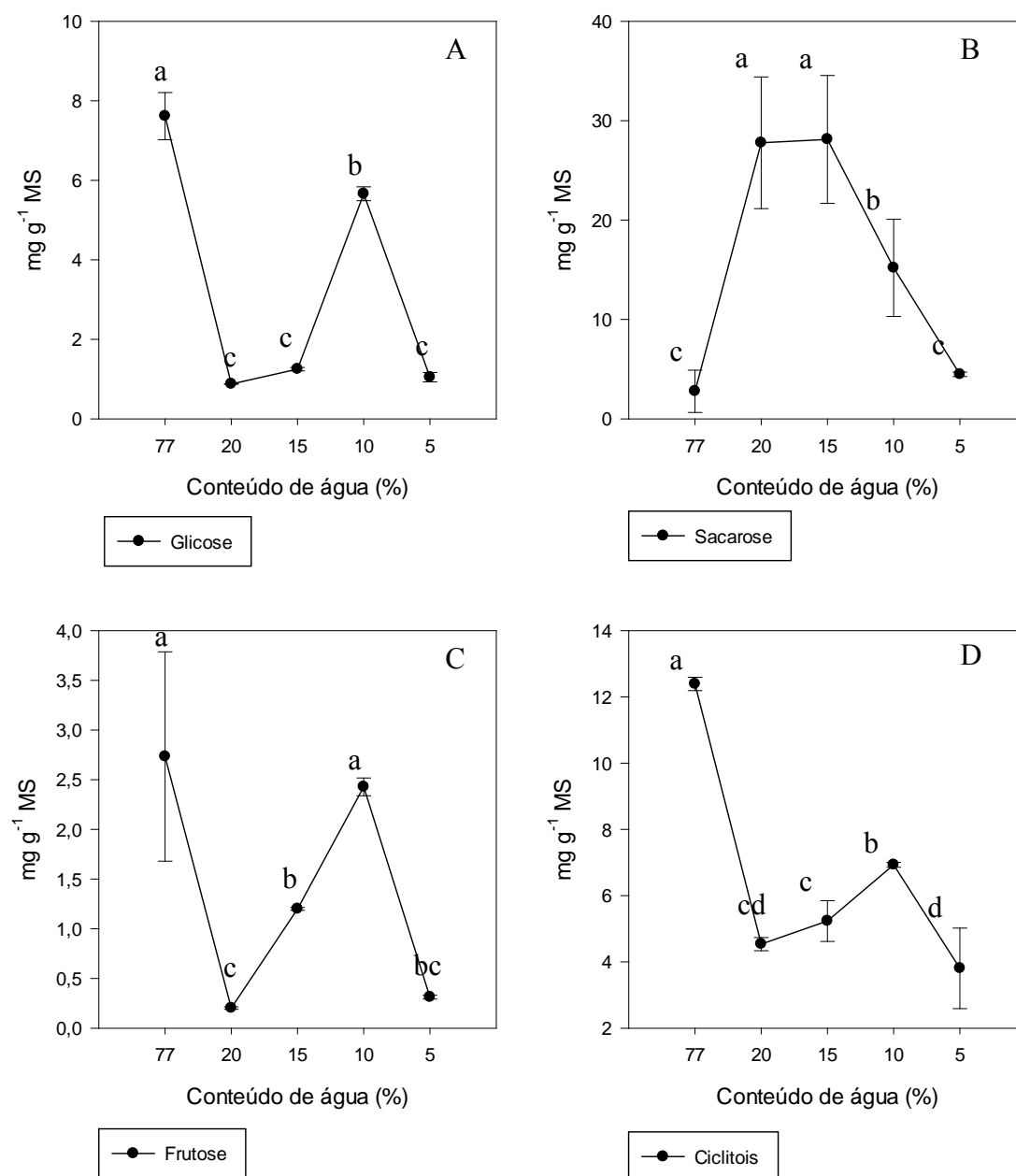
**Figura 1:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) aos 91 DAF (dias após a floração) submetidas à níveis de secagem à 32°C. A: 59% água, B: 20% de água, C: 15% de água, D: 10% de água e E: 5% de água.



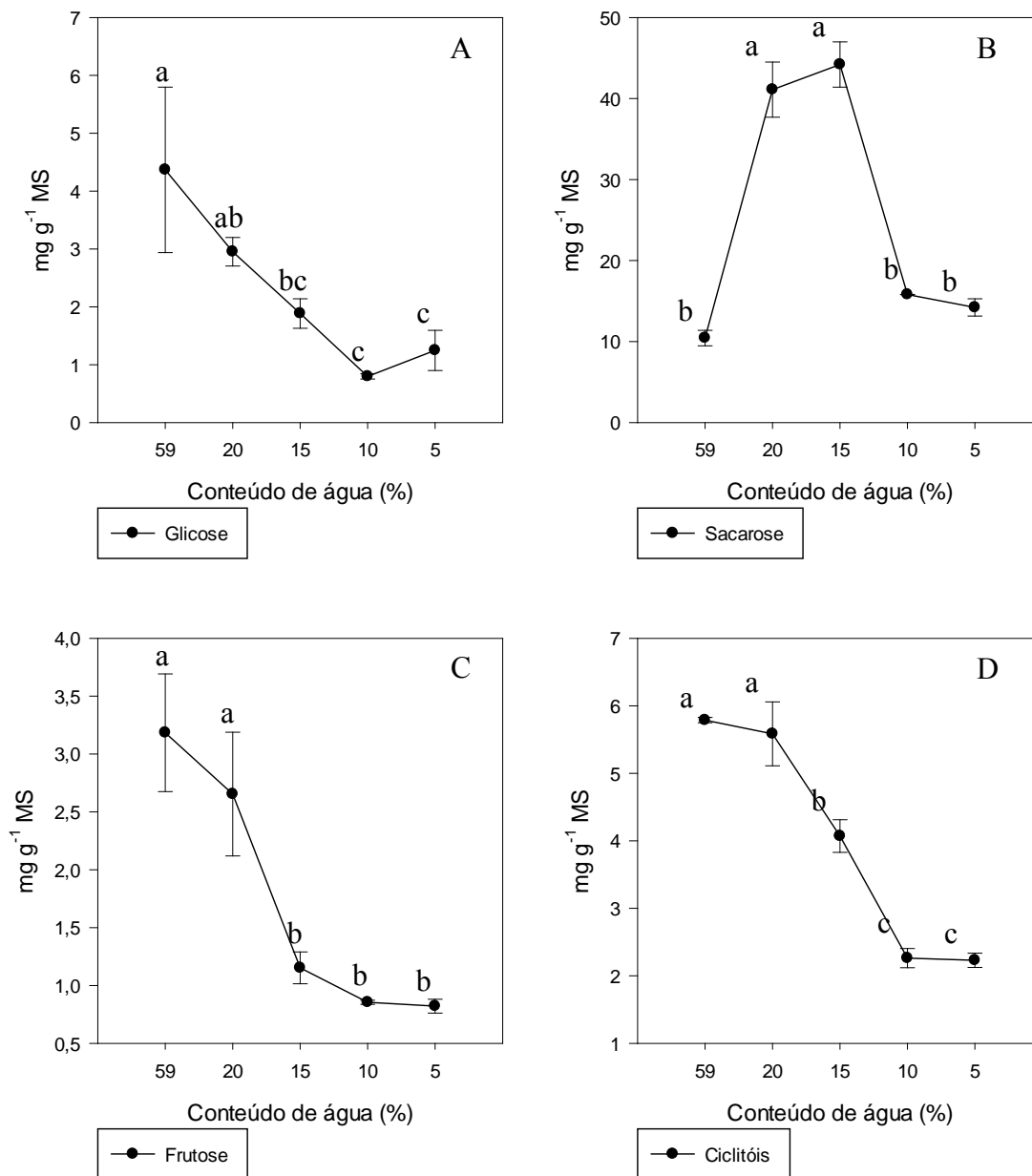
**Figura 2:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) aos 116 DAF (dias após a floração) submetidas à níveis de secagem à 32°C. A: 35% água, B: 20% de água, C: 15% de água, D: 10% de água e E: 5% de água.



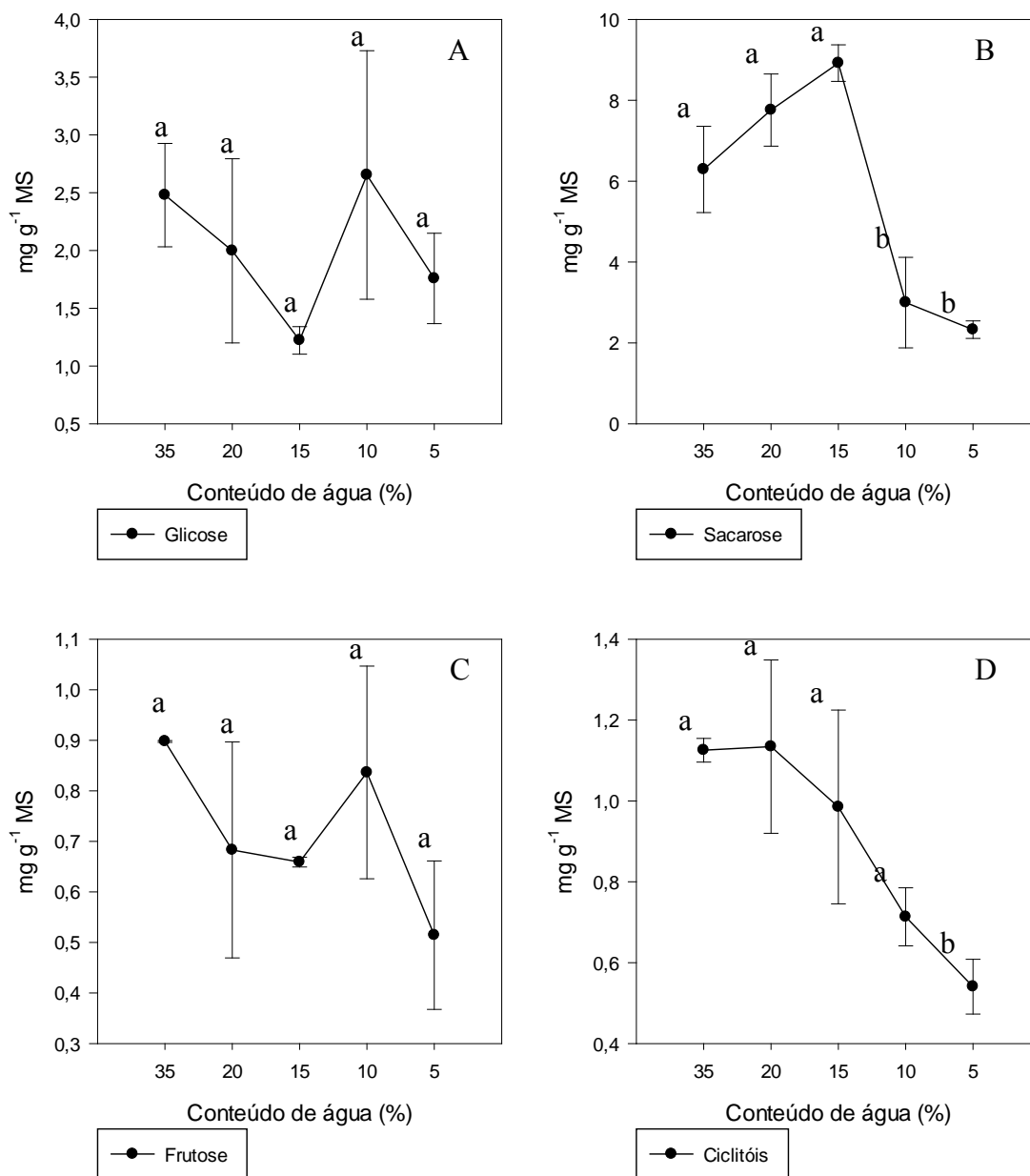
**Figura 3:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) aos 133 DAF (dias após a floração) submetidas à níveis de secagem à 32°C. A: 27% água, B: 20% de água, C: 15% de água, D: 10% de água e E: 5% de água.



**Figura 4:** Perfil de açúcares solúveis ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer aos 49 DAF (dias após a floração) submetidas à secagem artificial em estufa à  $32^{\circ}\text{C}$ . A: glicose, B: sacarose, C: frutose e D: ciclitóis.

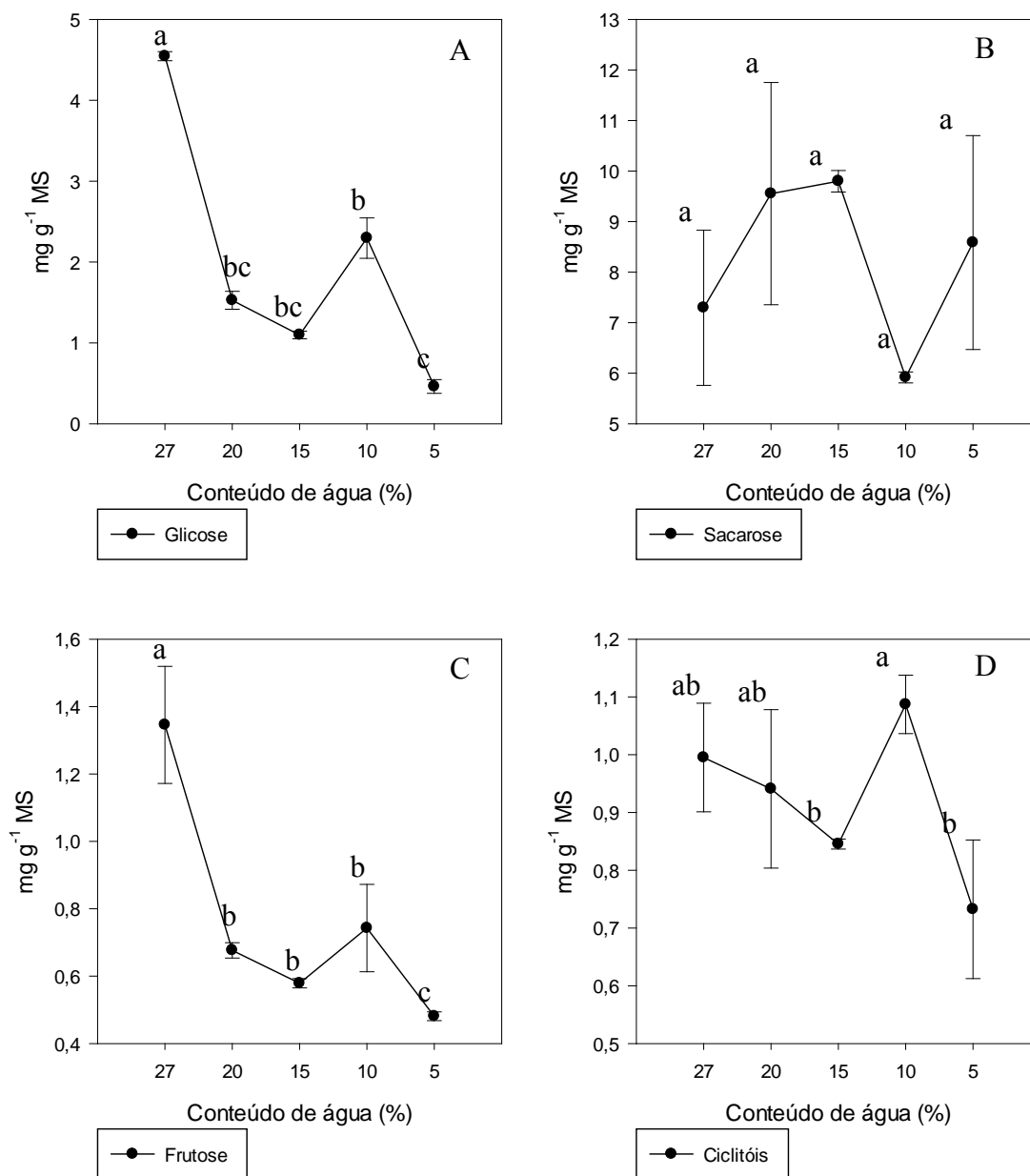


**Figura 5:** Perfil de açúcares solúveis ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer aos 91 DAF (dias após a floração) submetidas à secagem artificial em estufa à  $32^\circ\text{C}$ . A: glicose, B: sacarose, C: frutose e D: ciclitóis.

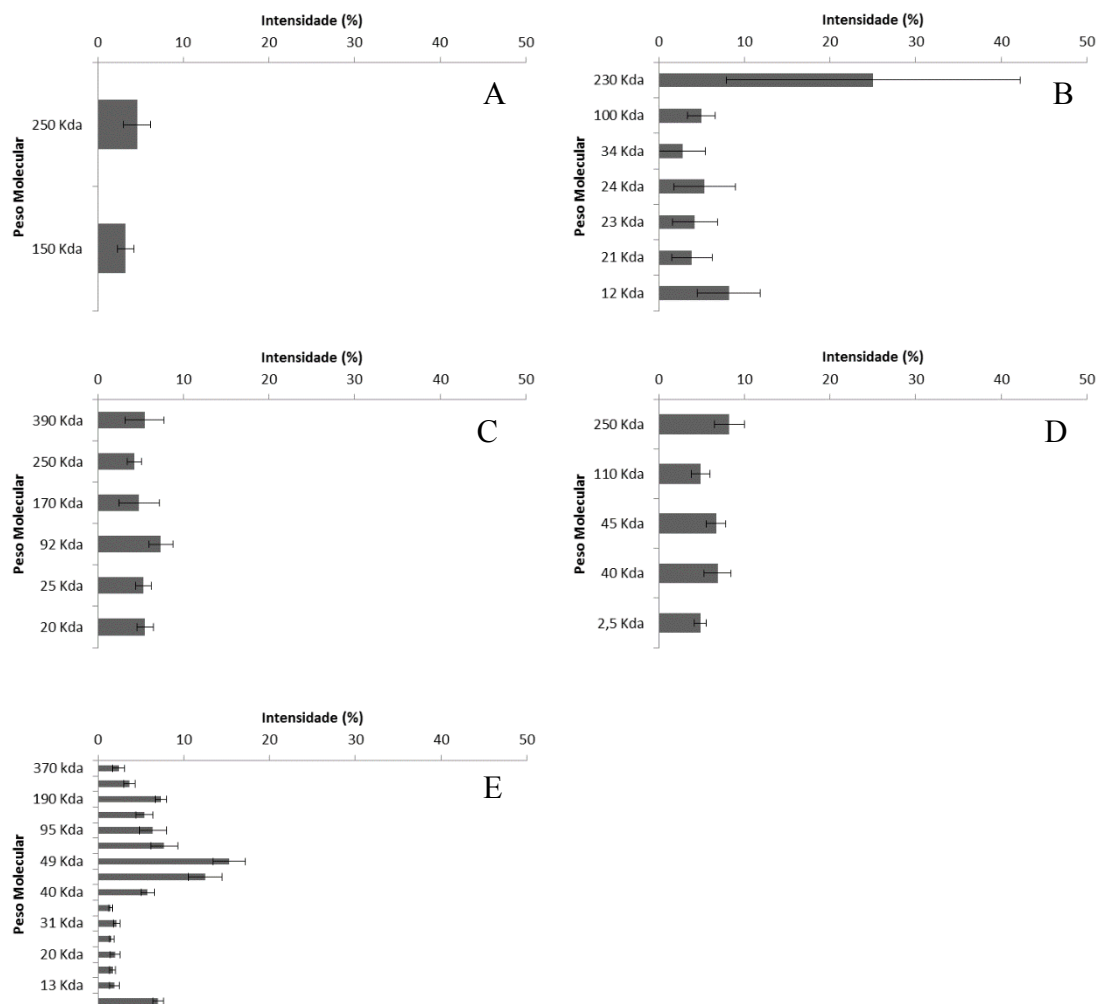


**Figura 6:** Perfil de açúcares solúveis ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer aos 116 DAF (dias após a floração) submetidas à secagem artificial em estufa à  $32^{\circ}\text{C}$ . A: glicose, B: sacarose, C: frutose e D: ciclitóis.

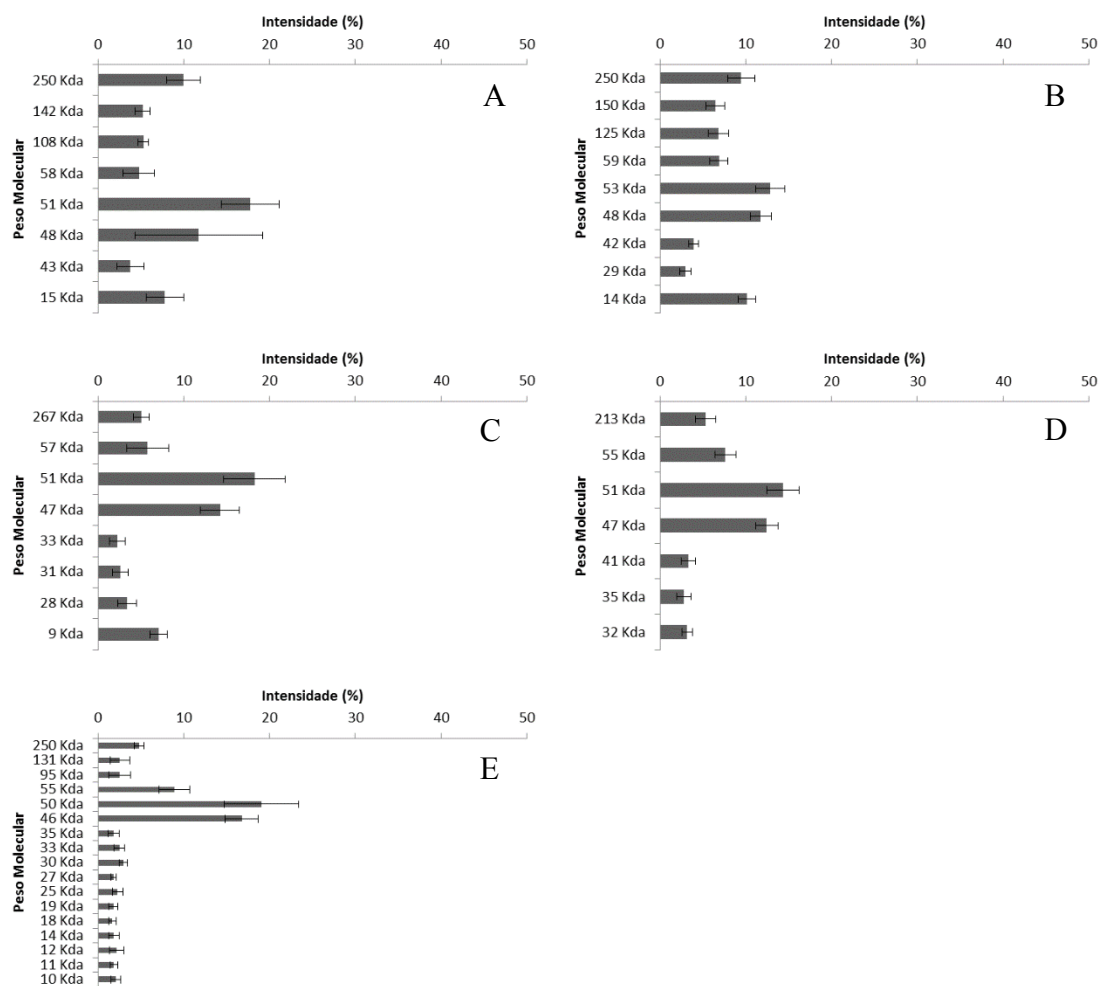




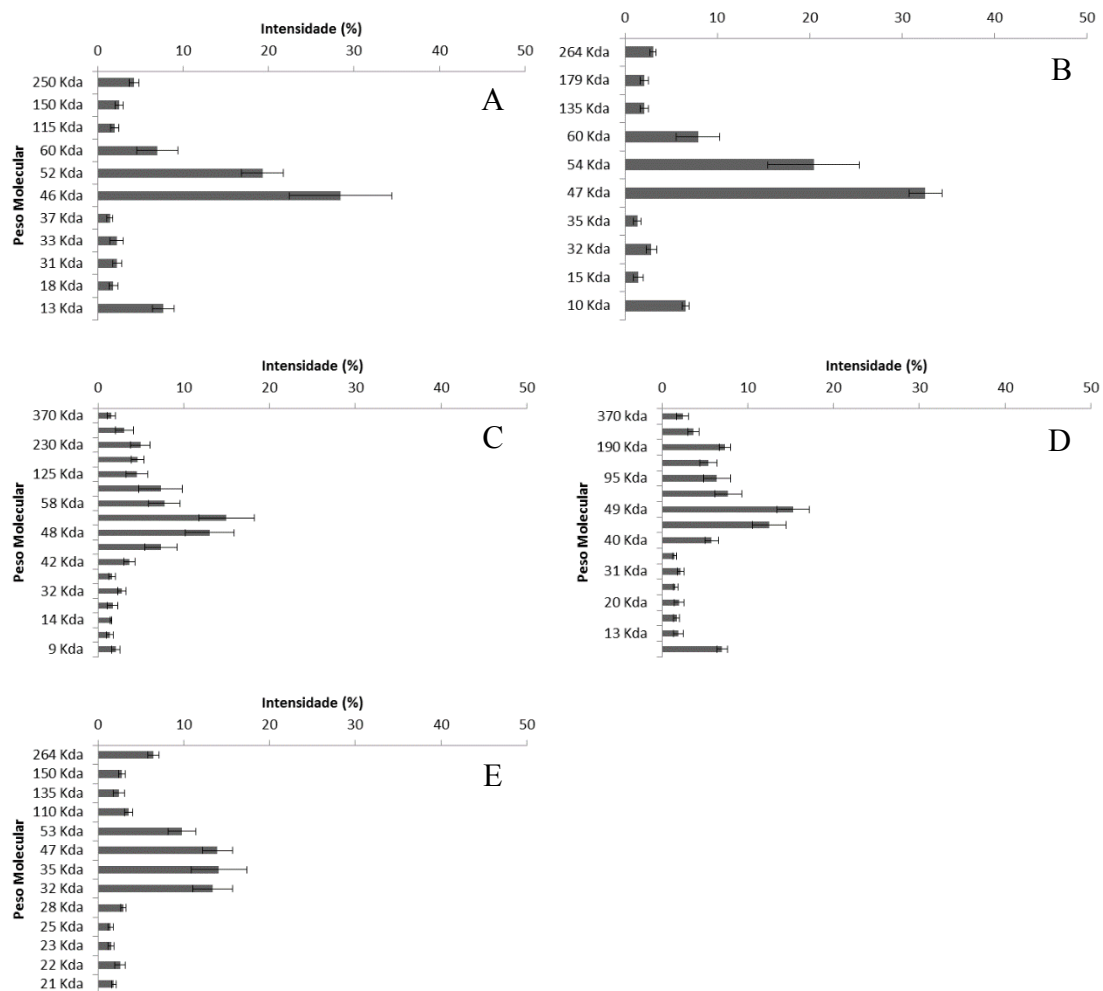
**Figura 7:** Perfil de açúcares solúveis ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer aos 133 DAF (dias após a floração) submetidas à secagem artificial em estufa à  $32^{\circ}\text{C}$ . A: glicose, B: sacarose, C: frutose e D: ciclitóis.



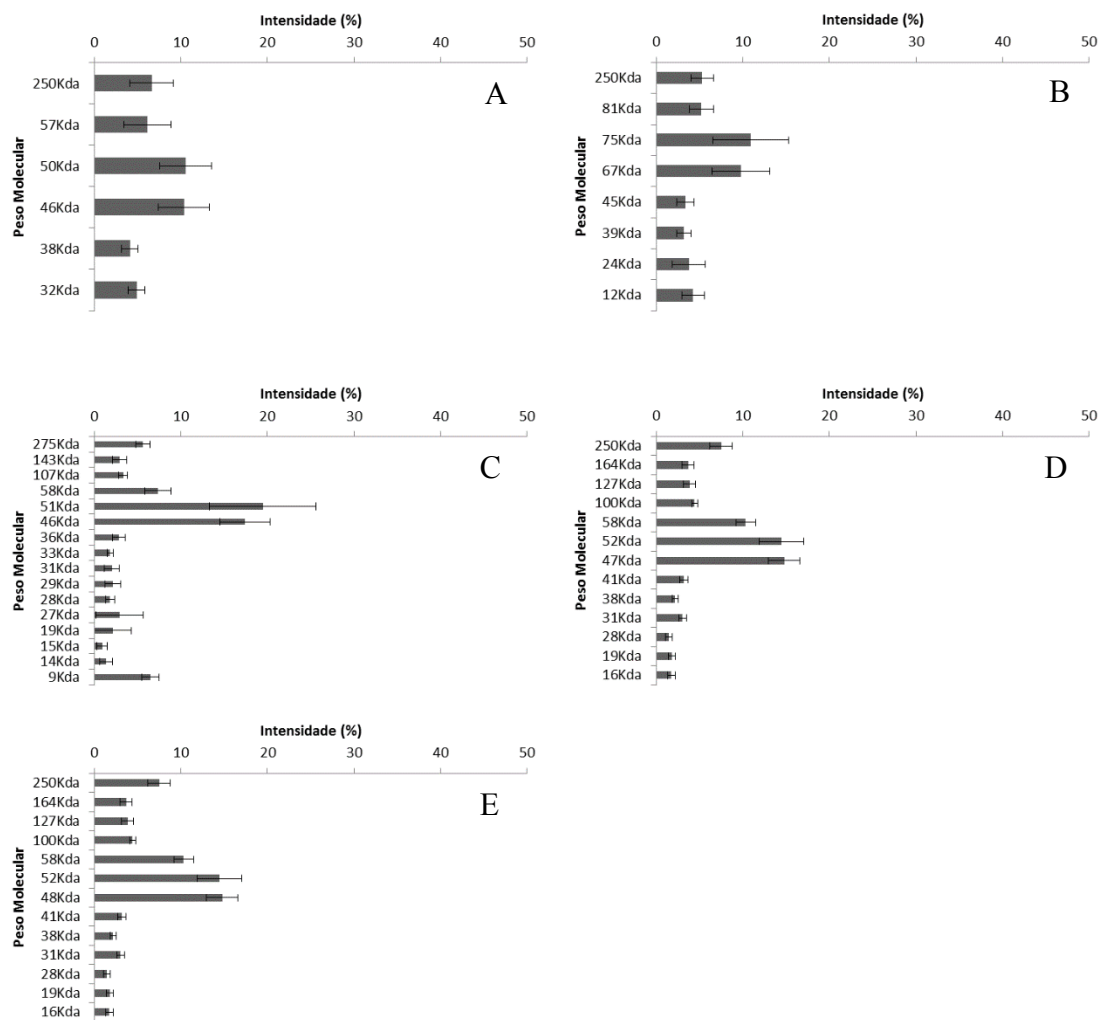
**Figura 8:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, aos 49 DAF (dias após a floração). A: 77% água, B: 20% água, C: 15% de água, D: 10% de água e E: 5% de água. Barras de desvio padrão comparando os diferentes pesos moleculares.



**Figura 9:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, aos 91 DAF (dias após a floração). A: 59% água, B: 20% água, C: 15% de água, D: 10% de água e E: 5% de água. Barras de desvio padrão comparando os diferentes pesos moleculares.



**Figura 10:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, aos 116 DAF (dias após a floração). A: 35% água, B: 20% água, C: 15% de água, D: 10% de água e E: 5% de água. Barras de desvio padrão comparando os diferentes pesos moleculares.

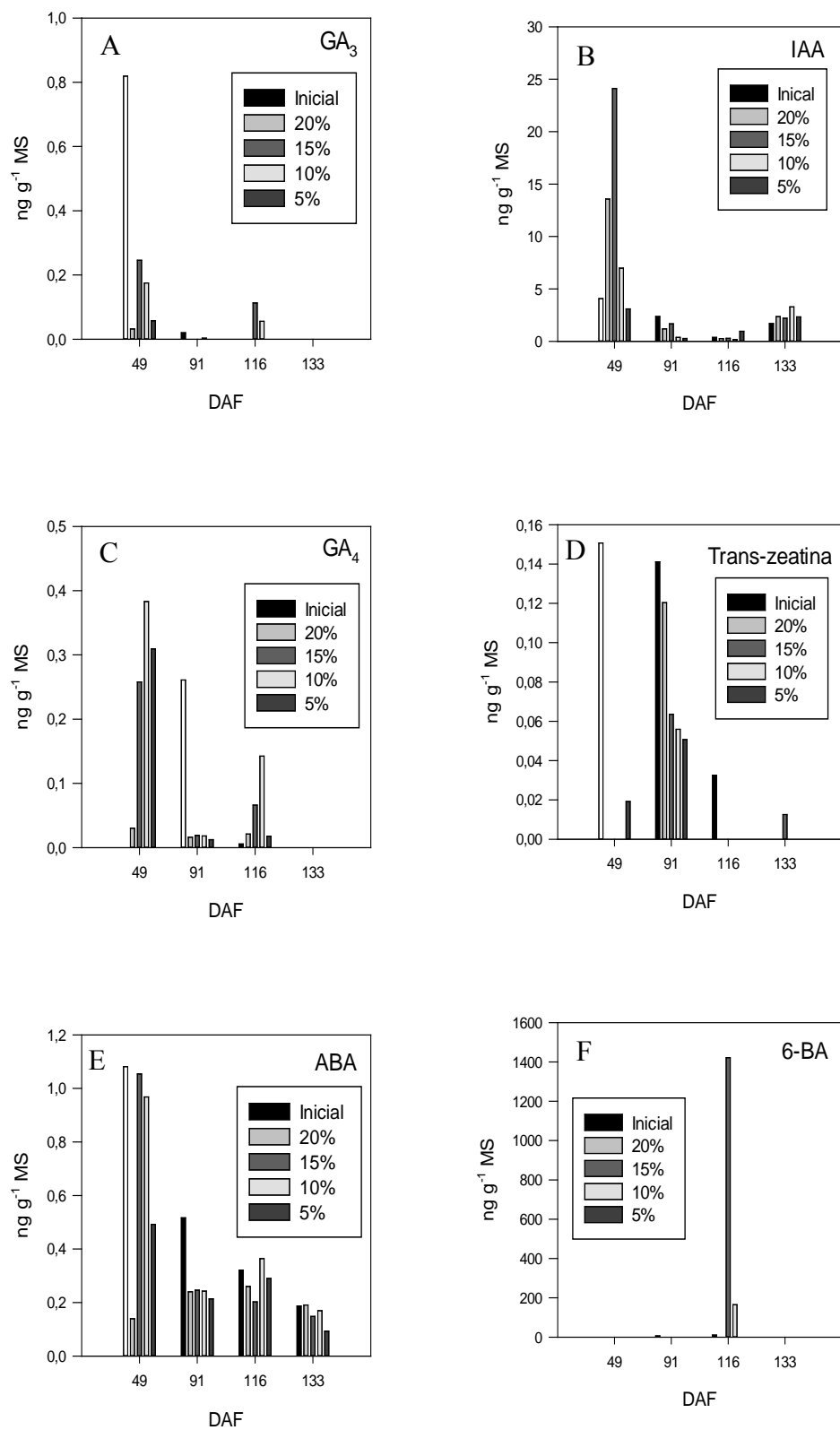


**Figura 11:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, aos 133 DAF (dias após a floração). A: 27% água, B: 20% água, C: 15% de água, D: 10% de água e E: 5% de água. Barras de desvio padrão comparando os diferentes pesos moleculares.

**Tabela 3:** Atividade específica da peroxidase [POD ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ )], superóxido dismutase [SOD ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )] e teores de lipoperóxido [MDA ( $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ )] das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem à 32°C.

	49	91	116	133
	POD ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ )			
Inicial	0,010 aA	0,003 aB	0,002 aB	0,002 aB
20%	0,002 bA	0,002 aA	0,001 aA	0,002 aA
15%	0,002 bA	0,002 aA	0,002 aA	0,002 aA
10%	0,002 bA	0,003 aA	0,002 aA	0,001 aA
5%	0,002 bA	0,002 aA	0,001 aA	0,001 aA
C.V (%)	28,70			
	SOD ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )			
Inicial	0,372 aA	0,144 aB	0,204 aB	0,167 aB
20%	0,344 abA	0,208 aAB	0,153 aB	0,152 aB
15%	0,264 abA	0,193 aA	0,178 aA	0,125 aA
10%	0,205 bA	0,137 aA	0,157 aA	0,174 aA
5%	0,208 bA	0,167 aA	0,166 aA	0,164 aA
C.V (%)	27,92			
	MDA ( $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ )			
Inicial	21,983 aA	9,362 aBC	8,559 aC	13,610 abB
20%	13,248 bA	7,983 aB	8,496 aB	15,725 aA
15%	13,624 bA	4,781 aB	7,401 aB	15,483 aA
10%	11,541 bcA	6,165 aB	7,721 aAB	9,701 bAB
5%	8,190 cA	8,352 aA	5,566 aAB	2,264 cB
C.V (%)	24,10			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



**Figura 12:** Perfil Homonal (ng g<sup>-1</sup> MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas à níveis de secagem à 32°C. A: GA<sub>3</sub>, B: IAA, C: GA<sub>4</sub> D: Trans-zeatina E: ABA, F: 6-BA.

## 6. CAPÍTULO 3

**ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H.  
RAINER<sup>5</sup>**

---

<sup>5</sup> Artigo nas normas do periódico: Journal of Experimental Botany



## ARMAZENAMENTO DAS SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER

Jaqueline Malagutti Corsato<sup>1\*</sup>; Gisela Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UNESP, Caixa Postal 510, Botucatu, CEP: 18608-970, São Paulo, Brasil. Email: [gisela.unesp@yahoo.com.br](mailto:gisela.unesp@yahoo.com.br)

\*Autor para correspondência. Email: [jaque\\_corsato@hotmail.com](mailto:jaque_corsato@hotmail.com), Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Caixa Postal 510, Botucatu, CEP: 18608-970, São Paulo, Brasil

**Resumo:** A espécie *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum-de-terra-fria) é utilizada como portaenxerto para espécies da família Annonaceae. Sugere-se que a semeadura dessa espécie seja realizada logo após a extração das sementes, indicando que essas não toleram o armazenamento. Assim, o objetivo foi avaliar a capacidade de armazenamento das sementes de *A. emarginata* (araticum-de-terra-fria). O experimento foi realizado com delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo 5 teores de água x 4 épocas de armazenamento. Foram realizadas coletas aos 49, 91, 116 e 133 DAF e as sementes provenientes desses diferentes estádios de maturação foram submetidas ao teste de germinação e secagem. As sementes foram armazenadas com o teor de água inicial e reduzido para 20%, 15%, 10% e 5% de água, durante dois, quatro e seis meses à temperatura de -5°C. Após cada período de armazenamento as sementes passaram por análises bioquímicas (açúcares solúveis totais; proteínas LEA; atividade da peroxidase; atividade da superóxido dismutase; teores de lipoperóxido, quantificação hormonal). Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5%. Concluímos que as sementes de *A. emarginata* apresentam baixa capacidade de armazenamento, podendo ser armazenadas à -5°C por até 60 dias após a dispersão (133 DAF), com teor de umidade de 10%.

**Palavras-chave:** araticum-de-terra-fria, longevidade, viabilidade, sistemas antioxidantes, açúcares solúveis, níveis hormonais.

## **Introdução**

A redução no conteúdo de água em sementes tolerantes à dessecação, resulta em decréscimo da atividade metabólica, o que possibilita manter a capacidade de germinação por períodos consideráveis (Rajjou e Debeaujon, 2008). Assim, a tolerância à dessecação está relacionada com o período de armazenamento suportado pela espécie, cujo objetivo é manter a qualidade e a viabilidade por longos (Villela & Peres, 2004).

Enquanto são armazenadas, as sementes passam por um processo de deterioração, perdendo vigor, tornando-se mais sensíveis à estresse durante a germinação e conseqüentemente a longevidade da espécie é reduzida (Rajjou e Debeaujon, 2008). Esse processo de envelhecimento que ocorre ao longo do armazenamento é caracterizado por fatores genéticos da espécie e também pelas condições ambientais em que essas encontram-se (Vertucci e Ross 1993; Nguyen et al. 2012). Assim, a manutenção da capacidade germinativa das sementes no período compreendido entre o beneficiamento dos frutos até a semeadura é obtida através do emprego de técnicas adequadas de armazenamento, as quais controlam fatores como a temperatura e a umidade (Roberts, 1973; Oliveira et al., 2006).

Dentre as alterações observadas ao longo do armazenamento das sementes, o esgotamento das reservas, destinadas a fornecer energia para o crescimento do embrião, parece ser a mais comum (Villela & Peres, 2004). No entanto, Rajjou e Debeaujon (2008) demonstraram que ao longo da evolução, surgiram vários sistemas de proteção, desintoxicação e reparo, os quais otimizam a vida útil das sementes, permitindo a manutenção da longevidade desse material, tais como as proteínas da embriogênese tardia (LEA), sacarose, oligossacarídeos e a atividade de enzimas antioxidantes.

Mesmo em estado seco (10-5% de água), sementes armazenadas podem sofrer estresse oxidativo através da auto oxidação de lipídeos de membrana e de reserva, ou mesmo pela ação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (EROS) (Bailly 2004; Rajjou e Debeaujon, 2008).

Uma forma de reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo é através da formação do estado celular viscoso (vítreo), pela deposição de açúcares solúveis, principalmente a sacarose e oligossacarídeos como a rafinose e estaquiose, além das proteínas que surgem na embriogênese tardia (LEA), que também auxiliam nesse processo (Buitink e Leprince, 2008). Tanto os açúcares citados como as LEA aumentam a viscosidade citoplasmática e auxiliam na captura de espécies reativas do metabolismo do oxigênio, atenuando os danos celulares ao longo do armazenamento das sementes

(Rajjou e Debeaujon, 2008). Assim, sabendo que a longevidade das sementes pode ser afetada pela viscosidade do citoplasma, fica evidente a necessidade de um grau de umidade adequado para o armazenamento das sementes (Buitink e Leprince, 2008).

As sementes também apresentam vários mecanismos para a remoção dos radicais livres. Estes mecanismos envolvem principalmente a atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a peroxidase (POD), comumente encontradas nas sementes maduras em estado seco e especializadas em atenuar a atividade dos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio respectivamente (Rajjou e Debeaujon, 2008).

As sementes de Annonaceae são conhecidas por apresentarem diferentes mecanismos de dormência (Ferreira et al., 2013), pela necessidade de que a semeadura seja realizada logo após a extração dos frutos ou por não suportar o armazenamento (Tokunaga, 2000). Segundo Machado & Parente (1986) as sementes de anonáceas devem permanecer em meio úmido após a extração dos frutos, caso contrário a viabilidade das sementes pode ser reduzida, influenciando na porcentagem final de germinação. No entanto, Bernardes et al. (2007) verificaram que o armazenamento das sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.) em sacos de papel, reduz significativamente a porcentagem de germinação dessas sementes, sendo este parâmetro quase nulo após um ano de armazenamento.

A espécie *A. emarginata*, tem sido empregada com frequência como portaenxerto para atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*) e cheromóia (*Annona cherimola* Mill.) devido a sua rusticidade, no entanto, viveiristas relatam a incapacidade de armazenar tais sementes. Deste modo, formulou-se a hipótese de que sementes de *A. emarginata* não toleram o armazenamento à baixas temperaturas devido à ausência de açúcares solúveis, de proteínas LEA e de sistemas de enzimas antioxidantes (POD, SOD e Lipoperóxido), além da degradação de reservas proteicas, lipídicas e de açúcares.

O objetivo foi avaliar a capacidade de armazenamento das sementes de *A. emarginata* (araticum-de-terra-fria).

### **Material e Métodos**

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Fisiologia da Germinação e Dormência de Sementes do Departamento de Botânica pertencente ao Instituto de

Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, *Campus* de Botucatu – SP.

Em outubro de 2010 e outubro de 2011 foram marcadas flores de matrizes no Núcleo de Produção de Mudas da CATI localizado em São Bento do Sapucaí – SP (22° 41'20" sul e a uma longitude 45° 43' 51" oeste, altitude de 886 metros). A partir da data de marcação das flores foram determinadas quatro épocas de coleta (49, 91, 116 e 133 Dias Após a Floração – DAF) as quais abrangeram a formação, o desenvolvimento e a maturação dos frutos e sementes dessa espécie.

A determinação do teor de água inicial das sementes de *A. emarginata* foi realizada utilizando quatro repetições de 25 sementes por parcela. As sementes foram acondicionadas em estufa de secagem com circulação forçada de ar à temperatura de 103°C durante 17 horas (Ista, 2004). Os resultados do teor de água das sementes foram expressos em porcentagem (%), com base no peso úmido das sementes conforme a metodologia descrita pela Ista (2004).

As sementes extraídas dos frutos em cada época de coleta (91, 116 e 133 DAF) foram submetidas ao teste de germinação e análises bioquímicas (açúcares solúveis totais, proteínas LEA, lipídeos totais, proteínas solúveis totais, atividade da peroxidase, atividade da superóxido dismutase, teores de lipoperóxido e conteúdo hormonal) com delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo 5 teores de água x 4 épocas de armazenamento, totalizando 20 tratamentos com 4 repetições de 15 sementes por parcela.

Após os respectivos tratamentos, as sementes foram colocadas para germinar em papel de filtro (Germitest) umedecido com água destilada na proporção de duas vezes e meia o peso do papel seco (Brasil, 2009) e acondicionados em câmara de germinação com temperatura e fotoperíodo alternados, 20°C durante 18 horas de escuro e 30°C por seis horas de claro (Costa, 2009).

As avaliações quanto a germinação foram constituídas de contagem do número de sementes germinadas a cada dois dias, sendo considerado como germinada aquela que apresentou pelo menos 2 mm de raiz primária (Hadas, 1976). Foram calculadas as porcentagens, tempo médio (Edmond e Drapala, 1958), índice de velocidade (Silva e Nakagawa, 1995), frequência e sincronização da germinação (Laboriau e Agudo, 1987) e a porcentagem de plântulas normais (Brasil, 2009).

### **Açúcares solúveis**

Para a extração dos açúcares solúveis foram utilizados 100mg da semente inteira, foi acondicionada em tubos eppendorf, onde foi adicionado 1 mL de etanol 80% na proporção de 10:1. Os tubos foram incubados em banho a 80°C por 15 minutos (Dubois et al., 1956). Após incubação, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para tubos com capacidade de 5 mL. O mesmo procedimento foi repetido duas vezes com o substrato restante e o volume final do extrato foi ajustado para 3mL. A união dos três sobrenadantes resultou no extrato com a fração de açúcares solúveis que foi analisada.

Após a extração do material foi realizada a determinação dos açúcares solúveis totais pelo método do fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956). Para a purificação das amostras foi utilizado 1ml de amostra, a qual passou em resina catiônica e aniônica. O pH das amostras foi corrigido com hidróxido de amônio e ácido clorídrico e, posteriormente, estas foram armazenadas em freezer (Garcia et al., 2006). As amostras foram liofilizadas e suspendidas em 1ml de água deionizada. As amostras foram aplicadas na coluna de dosagem CARBO PAC1 (2 x 250 mm) e, então, determinado o perfil de açúcares solúveis das amostras (Garcia et al., 2006).

### **Proteínas LEA**

Para a extração de proteínas LEA foi seguida a metodologia descrita por Rosa et al. (2005). As sementes inteiras foram maceradas em tampão de extração 50 mM Tris-HCl (pH = 7,5), 500 mMNaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 mM do inibidor de protease PMSF na proporção de 1:10 (peso do material: volume do tampão). O material foi centrifugado a 12000 rpm à 4°C por 45 minutos e o sobrenadante incubado em banho Maria a 85°C por 15 minutos.

As amostras foram novamente centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante resultou na fração de proteínas LEA. 80 µL de tampão da amostra (2,5 mL de glicerol, 0,46g SDS, 20mg de azul de bromofenol, Tris-HCl pH = 7,5) foram adicionados em 20 µL de cada extrato, seguido de uma incubação em banho-maria com água em ebulição por cinco minutos. Foram aplicados 10 µL de cada amostra em gel de poliacrilamida 12,5% (gel separador) e 4% (gel de empilhamento). A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical à temperatura ambiente e voltagem constante de 50V por cinco horas. Após a corrida, os géis foram corados em solução de

Comassie Brilliant Blue a 0,05% por 24 horas e descoradas com solução de etanol a 5%, ácido acético 10% e água 85%, conforme Alfenas (1988).

Os géis foram salvos e suas imagens digitalizadas através do Image Master VDS e software analisador de imagens do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP, *campus de Botucatu* - SP. O programa foi utilizado para determinar o IOD (intensidade de densidade óptica de cada banda proteica) e os resultados foram expressos em intensidade de bandas.

### **Lipídeos Totais**

A quantidade de lipídeos presente nas sementes de *A. emarginata* foi obtida pela extração com hexano em um aparelho extrator Soxhlet por 8 horas (método descrito pela AOCS Bc 3-49 (AOCS, 1993)). Para 1 grama de semente inteira macerada, 130 ml do solvente foram utilizados. Após a extração, o solvente foi evaporado através de um rotavapor. O método foi repetido mais três vezes e a fração de lipídeos totais determinada pela massa de lipídeos gerada.

### **Proteínas solúveis totais**

Para a extração das proteínas solúveis totais foi seguida a metodologia de Kar e Mishra (1976). Foram utilizados 600 mg de sementes inteiras, as quais foram trituradas em nitrogênio líquido homogeneizados com a auxílio de um almofariz em 5mL de tampão de extração fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8. O macerado centrifugado à 12000 rpm por 40 minutos. A determinação das proteínas solúveis totais foi realizada pelo método de Bradford (1976).

### **Atividade da enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)**

A atividade da peroxidase foi determinada de acordo com as condições citadas no trabalho de Teisseire e Guy (2000). O sistema de reação foi composto de 100 uL de extrato enzimático diluído no tampão de extração; tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,5; pirogallol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol.L<sup>-1</sup> e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 5 mmol L<sup>-1</sup>. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 5 minutos e resulta na formação de purpurugalina, a qual foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430nm e seu coeficiente de extinção molar (2,47 mmol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em umol de purpurugalina min<sup>-1</sup> de proteína.

### **Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi realizada pelo método de Beauchamp e Fridovich (1971), citados por Bor et al. (2003). O sistema de reação é composto de 30µL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,8, mistura “nitrobluetetrazolium” (NBT) 33 µmol L<sup>-1</sup> + EDTA 0,66 mmol L<sup>-1</sup> (5:4) e mistura L-metionina 10 mmol L<sup>-1</sup> + riboflavina 3,3 mol L<sup>-1</sup> (1:1), totalizando um volume de 3,0mL. Após iluminação dos tubos por 5 minutos a 25°C, a redução do NBT a “blue formazan” foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 560 nm. A atividade da SOD foi expressa em U mg<sup>-1</sup> de proteína.

### **Teores de lipoperóxido**

Os níveis de peroxidação de lipídeos foram avaliados utilizando a metodologia de Heath e Packer (1968). Para isso, foram utilizados 100 mg de sementes inteiras as quais foram maceradas em almofariz adicionando-se 2ml de um meio de reação constituído por ácido tiobarbitúrico (0,25%, m/v) e ácido tricloro acético (10%, m/v). A solução foi acondicionada em tubos de ensaio vedados e incubados em banho-maria a 95°C por 1 hora. A solução resultante foi centrifugada a 12000 rpm por 40 minutos a 25°C. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda 532 e 600nm. O montante de malondialdeído (MDA) formado foi calculado utilizando um coeficiente de extinção de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### **Hormônios**

Para a extração e quantificação dos hormônios (ABA, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, IAA, 6-BA, trans-zeatina e IBA) foi adaptada a metodologia de Ma et al., 2013. Foram utilizados 100mg de material acondicionado em tubos eppendorf, onde foi adicionado 1 mL da solução contendo: 40mL de metanol: 40mL de acetonitrila : 20mL de água Milli-Q : 1mL de ácido acético, na proporção de 10:1. Os tubos foram agitados em Vortex por 2 minutos, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para tubos com capacidade de 2mL. O mesmo procedimento foi repetido mais uma vez com o substrato restante e o volume final do extrato foi ajustado para 2mL. A união dos dois sobrenadantes resultou no extrato com a fração de hormônios que foi analisada por cromatografia de alta performance (HPLC).

A separação cromatográfica foi feita em um HPLC Shimadzu modelo Prominence composto dos seguintes módulos: Desgaseificador de fase móvel DGU-

20A, sistema de bombeamento quaternário composto pelas bombas LC-20AD, autoamostrador modelo SIL-20ACHT, controlador CBM-20A e forno para colunas modelo CTO-20AC. Foi usada uma coluna Sinergi 2.5 um Hydro RP-100A 50x4.6mm. A coluna foi mantida a temperatura de 40°C durante as determinações. O efluente da coluna foi introduzido em um Espectrômetro de Massas do tipo Triploquadrupolo (MS/MS) marca AB Sciex modelo 4500 equipado com fonte de ionização tipo ESI (eletrospray) na interface.

### **Resultados**

Os dois ciclos estudados (outubro de 2010 e outubro de 2011) apresentaram o mesmo padrão de resposta, por esse motivo os resultados apresentados à seguir refere-se apenas ao ciclo referente à outubro de 2010 até fevereiro de 2011.

Sementes que ainda não alcançaram a maturidade fisiológica (91 DAF) não permitem secagem nem o armazenamento. Estas sementes quando apresentavam teor de água inicial (59%) e reduzido para 20 e 15% não germinaram após o armazenamento por 60, 120 e 180 dias. Já as sementes que com teores de água de 10 e 5% apresentaram germinação, embora reduzidas, após 60 e 120 dias de armazenamento para sementes com 10% de água e aos 60 dias para sementes com 5% de água (Tabela 1).

Aos 116 DAF, as sementes já apresentavam maturidade, porém a germinação só ocorreu após 60 dias de armazenamento, se submetidas a 15, 10 e 5% de secagem. No entanto, estas porcentagens de germinação 58,33%, 50% e 30 % (respectivamente) é significativamente menor em relação as sementes recém extraídas 80%, 80% e 70% (Tabela 1). Quando as sementes são dispersas aos 133 DAF, observa-se a máxima germinação (61,66%) quando as sementes foram secas até 10% de água e armazenadas por 60 dias (Tabela 1).

Verificamos que a o armazenamento das sementes quando imaturas (91 DAF) e após atingirem a maturidade fisiológica (116 e 133 DAF), leva a redução significativa das proteínas solúveis nas sementes de *A. emarginata* (Tabela 2). Além das proteínas, os açúcares solúveis, que também servem como reserva nas sementes (glicose, frutose e sacarose) também foram reduzidos ao longo do armazenamento (Tabelas 3, 4 e 5). Observamos também que, o armazenamento levou a um acúmulo de rafinose para as sementes aos 91 DAF com teor de água inicial (59%), armazenadas por 120 dias e também para sementes com 10% armazenadas por 180 dias, sendo esse acúmulo também verificado nas sementes armazenadas aos 116 e 133 DAF (Tabelas 3, 4 e 5).



A análise dos lipídeos totais demonstrou heterogeneidade no armazenamento à -5°C, sendo que em determinados momentos detecta-se aumento e em outros redução no conteúdo desses compostos. Sementes aos 91 DAF com teor de água inicial (59%) aumentam os níveis de lipídeos ao longo do armazenamento, enquanto a secagem associada do armazenamento levou à redução desses compostos. O armazenamento também levou ao aumento nos lipídeos para sementes aos 116 DAF com 15% de água após 120 dias, 10% de água após 180 dias de armazenamento e em sementes armazenadas com 5% de água após 60 e 180 dias (Tabela 6).

A atividade da POD aumenta após o armazenamento para as sementes de *A. emarginata*, independente do teor de água que apresentavam aos 91, 116 e 133 DAF (Tabela 7), enquanto a atividade da SOD não sofreu alterações significativas em relação à testemunha (Tabela 8).

Os teores de lipoperóxidos reduzem em sementes armazenadas aos 60, 120 e 180 dias que apresentavam teor de água reduzido (20, 15, 10 e 5%). Aos 116 DAF sementes com 59% de água armazenadas por 120 dias tiveram os teores de lipoperóxido aumentados, enquanto a redução do conteúdo de água das sementes seguida de armazenamento reduziram esses compostos. Após 60 e 180 dias de armazenamento para sementes aos 133 DAF, com conteúdo de água inicial (27%) e reduzido para 20 e 15% também houve redução nos níveis de lipoperóxido (Tabela 9).

A análise de proteínas LEA demonstra que, sementes aos 91, 116 e 133 DAF quando armazenadas apresentam um aumento no número e intensidade dessas proteínas, surgindo bandas de peso molecular de 75 a 50 KDa as quais mantêm-se ao longo de todo o armazenamento (Figuras 1, 2 e 3).

O perfil hormonal demonstrou que o conteúdo de GA<sub>4</sub>, ABA, IAA, trans-zeatina e 6-BA, foram reduzidos nas sementes com 59, 10 e 5% de água aos 91 DAF (Tabela 10). Para as sementes aos 116 DAF, verificamos que o conteúdo de ABA foi reduzido apenas para as sementes com 10% de água após 120 dias de armazenamento e nas sementes com 5% de água houve redução significativa na concentração do ABA após 180 dias de armazenamento. Os demais hormônios analisados (GA<sub>4</sub>, IAA e 6-BA), tiveram a concentração reduzida após o armazenamento das sementes (Tabela 11).

Diferente do observado aos 91 e 116 DAF, onde a concentração do ABA de maneira geral reduzia ao longo do armazenamento, em sementes aos 133 DAF o conteúdo de ABA aumentou nas sementes com teor de água inicial (27%) armazenadas

por 120 e 180 dias e para aquelas com 10% de água armazenadas por 60, 120 e 180 dias (Tabela 12).

### **Discussão**

Entre as espécies da família Annonaceae, há diversidade quanto ao comportamento das sementes durante o armazenamento. Machado & Parente (1986) relatam que sementes de anonáceas devem permanecer em meio úmido após a extração dos frutos, caso contrário a viabilidade das sementes pode ser reduzida, influenciando a porcentagem final de germinação. Por outro lado, Carvalho et al. (2001) demonstraram que sementes de *Annona glabra* L. suportam redução no teor de água e congelamento, com germinação acima de 90% após 365 dias de armazenamento.

Quanto as sementes de *A. emarginata* verificamos que independente da época de coleta das sementes, o armazenamento à -5°C não foi favorável para a espécie (Tabela 1), o que já havia sido relatado por Tokunaga (2000) que recomenda que a semeadura seja realizada logo após a colheita, restringindo a produção de mudas em apenas uma época do ano.

Segundo Bonjovani e Barbedo (2008) quanto maior o teor de água das sementes durante o armazenamento, maiores são os danos gerados, pois a atividade metabólica não é reduzida e as sementes mantêm o metabolismo ativo, levando ao esgotamento das reservas energéticas destinadas à fornecerem energia para o crescimento do embrião. No entanto, até mesmo em teores de água baixos (10 e 5%), observamos que as sementes de *A. emarginata* perderam a capacidade germinativa e reduziram significativamente as reservas energéticas, principalmente após 120 e 180 dias.

Além disso, fica evidente que o estágio de desenvolvimento das sementes interfere na manutenção da germinabilidade ao longo do armazenamento (Tabela 1), pois quanto mais imaturas são as sementes (91 DAF) menor a capacidade de germinar após a secagem seguida de armazenamento à -5°C (Tabela 1). Segundo Silva et al. (2007), as sementes de Annonaceae seriam dispersas apresentando dormência morfofisiológica, sendo necessário um período pós dispersão para que o embrião completasse o seu desenvolvimento. Porém sementes de *A. emarginata* quando armazenadas sem completar o seu desenvolvimento ainda ligadas à planta mãe (91 DAF), não permitiram o armazenamento (Tabela 1).

Vários fatores podem contribuir para a redução da capacidade germinativa ao longo do armazenamento, uma delas é o consumo das reservas energéticas necessárias para a retomada do crescimento embrionário durante a germinação (Bewley et al., 2013). Assim, sementes que ao longo do armazenamento apresentam grande redução de reservas energéticas (proteínas, açúcares e lipídeos), podem ter a germinação comprometida (Bewley et al., 2013), assim como ocorreu nas sementes de *A. emarginata*, onde houve significativa redução no conteúdo de proteínas solúveis independente do estágio de desenvolvimento e conteúdo de água em que as sementes foram armazenadas (Tabela 2).

Outra explicação para esta redução no conteúdo das proteínas verificado nas sementes de *A. emarginata*, pode ser devido a glicosilação desses compostos com açúcares redutores, através de reações de Amadori e Marllori (Murthy et al. 2003). Segundo Murthy e Sun (2000), há sementes que não apresentam danos celulares devido ao estresse oxidativo, perdem o vigor através de reações não enzimáticas, as quais levam a ligação de um açúcar redutor às proteínas, cujo complexo formado leva à danos estruturais.

O aumento na atividade da enzima peroxidase, nas sementes aos 91, 116 e 133 DAF ao longo do armazenamento (Tabela 7), mostra uma tendência ao estresse oxidativo devido o armazenamento, o que está relacionado com a perda da germinabilidade das sementes (Tabela 1), apesar dos teores de lipoperóxido terem sido reduzidos para a espécie, indicando à existência de algum outro mecanismo auxiliando na proteção à membrana e consequente redução de lipoperóxido (Tabela 9).

Neste contexto, sementes de *A. emarginata* não conseguem germinar após o armazenamento, porém apresentam alguma proteção ao sistemas de membranas evidenciado pela redução dos níveis de lipoperóxido para as sementes aos 116 e 133 DAF, quando armazenadas com teor de água de 20 e 15%. Assim, esses resultados sugerem que além de um sistema antioxidante eficiente outras moléculas podem estar relacionadas com a proteção celular (Fait et al., 2006; Barbedo et al., 2013).

Cabe observar que as proteínas da embriogênese tardia (LEA) além de permitirem a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas, também podem estar relacionadas com a manutenção da longevidade das sementes, durante o armazenamento (Rajjou e Debeaujon 2008), sendo importante ressaltar que estas proteínas LEA estão presentes nas sementes de *A. emarginata* e apresentam sua concentração intensificada durante o armazenamento.

A associação das proteínas LEA com a sacarose, açúcar comum ao longo das fases do desenvolvimento e maturação das sementes de *A. emarginata*, pode estar relacionada com a formação do estado vítreo nas células, permitindo assim a redução na mobilidade celular e sobrevivência das sementes à longo prazo (Buitink e Leprince, 2008). Além da sacarose, a rafinose e a estaquiose também são açúcares diretamente envolvidos com a formação do estado vítreo (Rajjou e Debeaujon, 2008).

Segundo Hinch et al. (2006) e Mello et al. (2011), o armazenamento das sementes à temperaturas negativas podem levar à síntese de açúcares, como a rafinose, que pode auxiliar na manutenção dos componentes celulares. Desta forma, pelo fato das sementes de *A. emarginata* apresentarem rafinose e proteínas LEA (Tabelas 7, 9, 10 e 11) após o armazenamento, o estado vítreo nessa espécie, deveria ser formado pelo sinergismo entre essas moléculas. No entanto, apesar das sementes apresentarem esses mecanismos eles são ineficientes em garantir a manutenção da germinabilidade ao longo do armazenamento, uma vez que a germinação das sementes foi reduzida significativamente (Tabela 1).

Outro aspecto que pode alterar o comportamento germinativo das sementes ao longo do armazenamento são as altas temperatura, as quais promovem alterações degenerativas como a desestabilização nas atividades de enzimas e a desestruturação e perda de integridade do sistema de membranas celulares, causada, principalmente, pela peroxidação de lipídios (Corte et al., 2010). No entanto, o armazenamento das sementes de *A. emarginata* foi realizado em temperatura negativa (-5°C) e por esse motivo era esperado que o metabolismo da semente fosse reduzido e os danos de armazenamento minimizados (Vertucci & Roos, 1993).

Cabe ressaltar que há sementes sensíveis ao congelamento (Stanwood, 1981), o que parece ser a situação das sementes em estudo, pois Corsato (2010) ao armazenar as sementes após a dispersão dos frutos de *A. emarginata* à temperatura de 5°C verificou que a germinação das sementes foi mantida por até 3 meses de armazenamento, enquanto nesse trabalho, quando as sementes foram armazenadas à -5°C, verificamos apenas germinação semelhante à testemunha quando o material foi armazenado aos 133 DAF (dias após a floração) por 60 dias.

Desta forma, em sementes que não permitem o congelamento, podem ocorrer danos devido à formação de cristais de gelo, devido a ruptura mecânica, tanto da estrutura citoplasmática quanto da membrana celular, pela expansão da água congelada,

resultando na desagregação celular durante o descongelamento (Bonjovani e Barbedo, 2008; Martiniere et al. 2011).

Outro aspecto que pode reduzir a viabilidade das sementes durante o armazenamento refere-se aos lipídeos depositados como reservas nas sementes de *A. emarginata*, uma vez que segundo Nagel e Bomer (2010), as sementes com elevado conteúdo de óleo em seus tecidos (*Brassica oleracea* e *Helianthus annuus*) apresentam viabilidade menor ao longo do armazenamento, pois essas reservas correspondem à locais potenciais ao ataque de radicais livres, aumentando assim o estresse oxidativo.

A germinação das sementes de *A. emarginata* ao longo do armazenamento também pode ter sido afetada pela presença do ABA. Verificamos que aos 91 e 116 DAF o conteúdo de ABA e demais hormônios analisados decresceu ao longo do armazenamento. Porém, aos 133 DAF quando as sementes foram armazenadas com o teor de água inicial (27%), observamos um incremento significativo na concentração de ABA nas sementes armazenadas por 60, 120 e 180 dias (Tabela 6) coincidindo com ausência da germinação (Tabela 1). Dessa forma, acredita-se que essa elevada concentração de ABA acompanhada de baixas concentrações de giberelinas ( $GA_3$  e  $GA_4$ ) inibiram a germinação das sementes em estudo.

Desta forma, fica claro que as sementes de *A. emarginata* independente do estágio de desenvolvimento, não permitem o armazenamento à temperaturas negativas ( $-5^{\circ}C$ ) por longos períodos (180 dias), pois a germinação dessas sementes é reduzida significativamente. Os motivos que levam essa redução no potencial germinativo das sementes, parecem estar associados intolerância ao congelamento, mesmo com a presença de sacarose, rafinose e proteínas LEA em sua constituição atuando na proteção das membranas.

### **Conclusão**

Concluimos que as sementes de *A. emarginata* apresentam baixa capacidade de armazenamento, podendo ser armazenadas à  $-5^{\circ}C$  por até 60 dias após a dispersão (133 DAF), com teor de umidade de 10%.

### **Referências<sup>6</sup>**

---

<sup>6</sup> Referências nas normas da ABNT

ALFENAS, A. C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. p. 151-182.

BAILY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, p. 93-107, 2004.

BARBEDO, C.J.; CENTENO, D. da. C.; RIBEIRO, R. de. C.L.F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, v.40, n.4, p.583-593, 2013.

BERNARDES, T.G.; ESTRÊLA, C.T.; NAVES, R.V.; REZENDE, C.F.A.; MESQUITA, M.A.M.; PIRES, L. L. Efeito do armazenamento e de fitohormônios na qualidade fisiológica de sementes de araticum (*Annona crassiflora* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 3, p. 163-168, set. 2007.

BEAUCHAMP C., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem.**, v.44, n.1, p.276-87, 1971.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3 ed. New York: Springer, 2013. 392p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BONJOVANI, M.R.; BARBEDO, C.J. 2008. Sementes recalcitrantes: intolerantes a baixas temperaturas? Embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. toleram temperatura sub-zero. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 345-356.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regra de Análise de Sementes**. Brasília: departamento de produção vegetal, 2009, 398p.

BUITINK, J., LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C. R. Biologies*. 331 (2008) 788 – 795.

CARVALHO, J.E.U de; NASCIMENTO, W.M.O do; MULLER, C.H. Tolerância de sementes de araticum-do-brejo (*Annona glabra* L.) ao dessecamento e ao congelamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v.23, n.1, p.179-182, 2001.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; LEITE, H.G.; PEREIRA, B.L.C.; GONÇALVES, J.F.C. Estudo enzimático de deterioração de sementes de *melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.1, p.083-091, 2010.

COSTA, P.N. **Reguladores vegetais, luz e temperatura na germinação de sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer)**. 2009. 78p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DUBOIS, M. GILLES, K. A. , HAMILTON, J. K. , REBERS, P. A. , SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

- EDMOND, J. B.; DRAPALLA, W. J. . The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.71, p.428-443, 1958.
- FAIT, A., ANGELOVICI, R., LESS, H., OHAD, I., URBANCZYK-WOCHNIAK, E., FERNI, A.R. & GALILI, G. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. **Plant Physiology**, v.142, n.839-854, 2006.
- FERREIRA, G., GIMENEZ, J. I., CORSATO, J. M., OLIVEIRA, M. C. Germinação de sementes de anonáceas. In: FERREIRA, G., KAVATI, R., BOARO, C. S. F., FERRARI, T. B., LEONEL, S. Anonáceas: Propagação e produção de mudas. Editora FEPAF, 2013.
- GARCIA, I.S.; SOUZA, A.; BARBEDO, C.J.; DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology** v.66, p.739-745, 2006.
- HADAS, A. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.27, 1976.
- HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.125, p.189-98, 1968.
- HINCHA, D.K., POPOVA, A.V., CACELA, A. Effects of sugars on the stability of lipids membranes during drying. In **Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes**, (ed. L.A. Leitmannova), v. 3, p.189-217, 2006, Elsevier, Amsterdam.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. In: ISTA. **International Rules for Seed Testing**. Bassersdorf: ISTA, 2004. p.5.1- 5.5; 5A.1- 5A.50.
- LABOURIAU, L.G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *S. hispanica* L. 1. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.59, n.1, p.37-56, 1987.
- MACHADO, J.W.B.; PARENTE, T.V. Germinação de seis espécies frutíferas nativas do cerrado em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 8, n.1, p. 35-38, 1986.
- MELLO, J.I.O., CETENO, D.C., BARBEDO, C.J. FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperate. **Seed Science & Technology**, v.39, p.465-480, 2011.
- MURTHY U.M.N., PRAKASH P. KUMAR AND WENDELL Q. SUN. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 54, No. 384, pp. 1057-1067, 2003.

MURTHY U.M.N., SUN W.Q. Protein modification by the Amadori and Maillard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. **Journal of Experimental Botany** v.51, p.1221-1228, 2000.

NAGEL, M.; BORMER, A. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. **Seed Science Research**, v.20, p.1-12, 2010.

NGUYEN, T. PAUL KEIZER, FRED VAN EEUWIJK, SJEFF SMEEKENS, AND LEÓNIE BENTSINK. Natural Variation for Seed Longevity and Seed Dormancy Are Negatively Correlated in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Vol. 160, pp. 2083–2092, 2012.

OLIVEIRA, I.V.M.; CAVALCANTE, I.H.L. MARTINS, A.B.G. Armazenamento de sementes de *Dovyalis caffra*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n.3, p.539-541, 2006.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **C. R. Biologies**, n.331, p.796–805, 2008.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499-514, 1973.

SILVA, J.B.; NAKAGAWA, J. Estudos de fórmulas para cálculo de velocidade de germinação. **Informativo Abrates**, v.5, p.62-73, 1995.

TEISSEIRE, H., GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*), **Plant Sci.** 153 (2000) 65 – 72.

VERTUCCI, C.W.; ROOS, E.E. Seed storage temperature and relative humidity. **Seed Science Research**, v.3, p.215-216, 1993.

VILLELA, F.A.; PERES, W.B. Coleta, secagem e beneficiamento de sementes. In. FERREIRA, A.G.; BORGUETTI, R. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: ARTMED, p.265-281, 2004.



**Tabela 1:** Germinação (%) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas ao armazenamento à -5°C por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
91 DAF				
59%	76,66 aA	0,00 bB	0,00 aB	0,00 aB
20%	70,00 aA	0,00 bB	0,00 aB	0,00 aB
15%	73,33 aA	0,00 bB	0,00 aB	0,00 aB
10%	15,00 cA	10,00 aAB	1,66 aBC	0,00 aC
5%	24,99 bA	1,66 abB	0,00 aB	0,00 aB
C.V (%)	33,32			
116 DAF				
35%	75,00 abA	0,00 cB	0,00 cB	0,00 aB
20%	57,50 bA	0,00 cB	0,00 cB	0,00 aB
15%	80,00 aA	58,33 aB	16,66 abC	0,00 aC
10%	80,00 aA	50,00 aB	31,66 aC	0,00 aD
5%	70,00 abA	30,00 bB	3,33 bC	0,00 aC
C.V (%)	35,17			
133 DAF				
27%	81,66 abA	0,00 cB	0,00 bB	0,00 aB
20%	88,33 aA	10,00 bcB	1,66 bB	0,00 aB
15%	71,66 bA	1,66 cB	0,00 bB	0,00 aB
10%	50,00 cA	61,66 aA	18,33 aB	0,00 aC
5%	70,00 abA	23,33 bB	15,00 abB	0,00 aC
C.V (%)	31,60			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 2:** Conteúdo de proteínas solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas ao armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$  por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
91 DAF				
59%	677,73 aA	0,321 aB	0,023 aB	0,007 aB
20%	301,48 bA	0,321 aB	0,014 aB	0,006 aB
15%	313,92 bA	0,104 aB	0,012 aB	0,005 aB
10%	388,45 bA	0,043 aB	0,007 aB	0,005 aB
5%	323,75 bA	0,025 aB	0,008 aB	0,005 aB
C.V (%)	58,91			
116 DAF				
35%	415,46 aA	0,007 aB	0,002 aB	0,002 aB
20%	364,04 aA	0,007 aB	0,004 aB	0,002 aB
15%	293,32 aA	0,006 aB	0,003 aB	0,002 aB
10%	301,73 aA	0,004 aB	0,003 aB	0,002 aB
5%	298,00 aA	0,002 aB	0,002 aB	0,003 aB
C.V (%)	71,86			
133 DAF				
27%	484,00 aA	0,003 aB	0,002 aB	0,002 aB
20%	336,25 bA	0,003 aB	0,002 aB	0,002 aB
15%	346,02 bA	0,002 aB	0,002 aB	0,002 aB
10%	343,12 bA	0,003 aB	0,002 aB	0,002 aB
5%	258,58 cA	0,002 aB	0,002 aB	0,002 aB
C.V (%)	19,24			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 3:** Conteúdo de açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91 DAF (dias após a floração) submetidas ao armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$  por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
Glicose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
59%	4,368 aA	1,649 aB	1,196 aB	0,937 aB
20%	2,951 bA	0,176 bB	0,281 aB	0,226 aB
15%	1,885 bcA	0,144 bB	0,271 aB	0,169 aB
10%	0,798 cA	0,060 bA	0,093 aA	0,047 aA
5%	1,247 cA	0,095 bB	0,132 aB	0,124 aB
C.V (%)	45,04			
Frutose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
59%	3,184 aA	1,466 aB	1,131 aB	0,880 aB
20%	2,654 aA	0,120 bB	0,236 aB	0,197 bB
15%	1,153 bA	0,108 bB	0,357 bB	0,163 bB
10%	0,855 bA	0,059 bB	0,075 bB	0,039 bB
5%	0,821 bA	0,068 bB	0,122 bB	0,132 bB
C.V (%)	32,81			
Sacarose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
59%	10,431 cA	6,945 aB	2,692 aC	0,660 aC
20%	41,105 aA	1,414 bB	2,392 aB	1,996 aB
15%	44,202 aA	1,987 bB	1,692 aB	2,015 aB
10%	15,804 bA	1,986 bB	1,904 aB	1,993 aB
5%	14,213 bA	1,921 bB	1,740 aB	1,560 aB
C.V (%)	15,36			
Rafinose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
59%	0,000 aB	0,044 aB	0,416 aA	0,199 aAB
20%	0,000 aA	0,200 aA	0,178 abA	0,000 aA
15%	0,000 aA	0,113 aA	0,185 abA	0,210 aA
10%	0,000 aB	0,194 aAB	0,107 aAB	0,239 aA
5%	0,000 aA	0,205 aA	0,222 abA	0,187 aA
C.V (%)	59,96			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 4:** Conteúdo de açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 116 DAF (dias após a floração) submetidas ao armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$  por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
<b>Glicose (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
35%	2,479 aA	0,394 aB	0,415 aB	0,118 aB
20%	1,997 abA	0,033 aB	0,086 aB	0,117 aB
15%	1,222 bA	0,127 aB	0,033 aB	0,082 aB
10%	2,653 aA	0,075 aB	0,087 aB	0,132 aB
5%	1,758 abA	0,076 aB	0,063 aB	0,141 aB
C.V (%)	55,01			
<b>Frutose (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
35%	0,897 aA	0,379 aB	0,360 aBC	0,128 aC
20%	0,683 abA	0,042 bB	0,096 bB	0,120 aB
15%	0,659 abA	0,141 abB	0,047 bB	0,110 aB
10%	0,836 aA	0,087 bB	0,095 bB	0,138 aB
5%	0,514 bA	0,089 bB	0,084 bB	0,099 aB
C.V (%)	30,93			
<b>Sacarose (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
35%	6,291 bA	1,471 aB	1,775 aB	2,544 aB
20%	7,758 abA	0,794 aB	1,289 aB	2,081 aB
15%	8,919 aA	2,570 aB	0,908 aB	1,756 aB
10%	2,997 cA	1,607 aA	1,367 aA	2,019 aA
5%	2,327 cA	1,276 aA	0,907 aA	2,042 aA
C.V (%)	24,08			
<b>Rafinose (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
35%	0,000 aC	0,279 aB	0,310 aAB	0,379 aA
20%	0,000 aB	0,305 aA	0,266 aA	0,313 abA
15%	0,000 aB	0,290 aA	0,280 aA	0,332 abA
10%	0,000 aB	0,249 aA	0,287 aA	0,297 bA
5%	0,000 aB	0,256 aA	0,246 aA	0,216 cA
C.V (%)	11,69			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 5:** Conteúdo de açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 133 DAF (dias após a floração) submetidas ao armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$  por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
<b>Glicose (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
27%	4,545 aA	0,429 aB	0,196 abB	0,196 aB
20%	1,527 cA	0,148 aB	0,440 abB	0,201 aB
15%	1,098 cA	0,266 aB	0,598 aB	0,234 aB
10%	2,296 bA	0,157 aB	0,170 abB	0,142 aB
5%	0,461 dA	0,117 aA	0,077 bA	0,182 aA
C.V (%)	23,87			
<b>Frutose (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
27%	1,346 aA	0,312 aB	0,124 bB	0,135 aB
20%	0,677 bA	0,099 aB	0,450 abAB	0,214 aB
15%	0,579 bA	0,249 aA	0,591 aA	0,230 aA
10%	0,742 bA	0,133 aB	0,158 abB	0,150 aB
5%	0,481 bA	0,124 aA	0,083 bA	0,160 aA
C.V (%)	42,51			
<b>Sacarose (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
27%	7,295 abA	1,710 aB	2,510 aB	1,987 aB
20%	9,554 aA	2,142 aB	1,607 aB	0,854 aB
15%	9,798 aA	1,829 aB	1,539 aB	1,555 aB
10%	5,917 bA	1,740 aB	2,145 aB	1,598 aB
5%	8,585 abA	0,949 aB	0,588 aB	1,737 aB
C.V (%)	31,45			
<b>Rafinose (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
27%	0,000 aB	0,203 aAB	0,284 aA	0,219 aA
20%	0,000 aA	0,187 aA	0,151 abA	0,103 aA
15%	0,000 aA	0,190 aA	0,190 abA	0,100 aA
10%	0,000 aB	0,104 aAB	0,258 abA	0,224 aA
5%	0,000 aB	0,215 aA	0,052 bAB	0,116 aAB
C.V (%)	58,67			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 6:** Conteúdo de lipídeos (mg g<sup>-1</sup> MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas ao armazenamento à -5°C por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
91 DAF				
59%	95,753 aC	328,534 aA	283,640 aAB	212,082 aB
20%	98,702 aA	179,252 bA	119,491 bA	190,505 aA
15%	95,637 aA	109,045 bcA	168,032 bA	145,605 abA
10%	146,439 aA	158,439 bA	98,917 bA	174,155 abA
5%	104,477 aAB	11,130 cB	167,874 bA	58,989 bB
C.V (%)	26,21			
116 DAF				
35%	263,095 aA	265,915 bA	254,230 abA	298,995 aA
20%	230,965 aA	239,920 bA	166,805 bA	168,155 bA
15%	239,700 aBC	189,400 bC	361,900 aA	326,580 aAB
10%	178,235 aB	186,750 bB	265,570 abAB	347,220 aA
5%	204,810 aB	382,715 aA	197,240 bB	322,220 aA
C.V (%)	14,20			
133 DAF				
27%	271,370 aA	199,065 bA	220,685 bA	188,420 aA
20%	266,810 aA	132,910 bB	189,930 bAB	162,400 aB
15%	275,040 aA	189,810 bA	208,910 bA	243,525 aA
10%	269,810 aA	136,315 bC	167,945 bBC	255,935 aAB
5%	293,085 aAB	367,800 aA	326,685 aA	223,045 aB
C.V (%)	15,51			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 7:** Atividade da peroxidase [POD ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína)] das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas ao armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$  por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
91 DAF				
59%	0,003 aB	2,99 bA	2,23 abA	3,34 aA
20%	0,002 aB	2,99 bA	3,43 aA	2,93 aA
15%	0,002 aC	4,39 aA	2,09 bB	2,94 aB
10%	0,002 aB	3,34 abA	2,78 abA	2,49 aA
5%	0,002 aB	3,37 abA	2,29 abA	3,50 aA
C.V (%)	19,32			
116 DAF				
35%	0,002 aC	4,75 aA	2,37 aB	1,99 aB
20%	0,001 aC	4,66 abA	3,01 aB	1,99 aB
15%	0,001 aC	3,17 abcA	1,76 aAB	1,43 aBC
10%	0,002 aB	3,15 bcA	1,76 aA	2,30 aA
5%	0,001 aB	2,37 cA	2,77 aA	2,30 aA
C.V (%)	26,56			
133 DAF				
27%	0,002 aB	2,08 aA	2,33 aA	1,73 bA
20%	0,001 aC	2,25 aAB	2,51 aA	1,73 bB
15%	0,001 aC	2,14 aB	2,51 aB	3,49 aA
10%	0,001 aC	2,34 aB	2,51 aB	3,49 aA
5%	0,001 aC	2,33 aB	2,17 aB	3,49 aA
C.V (%)	12,39			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 8:** Atividade da superóxido dismutase [SOD ( $\text{U mg}^{-1}$  proteína)] das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas ao armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$  por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
91 DAF				
59%	0,143 aA	0,221 aA	0,160 aA	0,283 aA
20%	0,263 aA	0,204 aA	0,226 aA	0,166 aA
15%	0,262 aA	0,195 aAB	0,137 aB	0,254 aA
10%	0,236 aA	0,193 aA	0,226 aA	0,247 aA
5%	0,208 aA	0,213 aA	0,199 aA	0,253 aA
C.V (%)	19,36			
116 DAF				
35%	0,203 aA	0,250 abA	0,215 aA	0,164 aA
20%	0,181 aA	0,258 abA	0,201 aA	0,166 aA
15%	0,188 aA	0,289 aA	0,056 bB	0,179 aAB
10%	0,197 aA	0,136 bA	0,137 abA	0,224 aA
5%	0,102 aA	0,209 abA	0,139 abA	0,204 aA
C.V (%)	23,96			
133 DAF				
27%	0,167 aA	0,229 aA	0,145 abA	0,245 aA
20%	0,006 bB	0,163 abA	0,190 abA	0,164 aA
15%	0,149 aAB	0,172 abAB	0,074 bB	0,208 aA
10%	0,229 aA	0,078 bB	0,235 aA	0,173 aAB
5%	0,151 aA	0,168 abA	0,212 abA	0,262 aA
C.V (%)	27,11			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



**Tabela 9:** Teores de lipoperóxido (nmol MDA g<sup>-1</sup> MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas ao armazenamento à -5°C por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
91 DAF				
59%	9,36 aC	89,01 aA	26,92 aB	14,82 aC
20%	7,98 aB	16,37 bA	8,21 bB	8,63 abB
15%	4,78 aA	6,97 cA	8,47 bA	7,19 bA
10%	6,16 aA	6,67 cA	9,20 bA	7,97 abA
5%	8,35 aA	5,34 cA	6,83 bA	7,35 bA
C.V (%)	28,15			
116 DAF				
35%	8,55 aB	8,01 aB	12,01 aA	4,88 aC
20%	8,49 aA	7,92 aA	3,83 aB	4,61 aB
15%	7,40 abA	6,38 aA	4,54 aB	4,15 aB
10%	7,72 aA	3,79 bB	3,01 aB	4,19 aB
5%	5,56 bA	2,97 bB	3,34 aB	5,19 aA
C.V (%)	16,33			
133 DAF				
27%	13,61 abA	4,80 aB	5,67 abB	6,8 aB
20%	15,72 aA	5,23 aB	4,86 abB	5,86 aB
15%	15,48 aA	4,91 aB	9,15 aB	7,65 aB
10%	9,70 bA	6,00 aA	8,11 abA	9,11 aA
5%	2,26 cA	5,05 aA	3,84 bA	4,84 aA
C.V (%)	33,99			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 10:** Perfil Hormonal (ng g<sup>-1</sup> MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 91 DAF (dias após a floração) com conteúdo de água de 59, 10 e 5% após 0, 60, 120 e 180 dias de armazenamento à -5°C.

	59	10	5
	GA <sub>4</sub>		
0	158,79±28,20 aA	3,45±5,98 aB	2,37±4,11 aB
60	0,00±0,00 bA	0,00±0,00 aA	0,00±0,00 aA
120	0,00±0,00 bA	0,33±0,05 aA	0,00±0,00 aA
180	3,19±5,43 bA	0,00±0,00 aA	0,00±0,00 aA
C.V(%)			
	ABA		
0	136,56±24,71 aA	64,17±6,25 aB	56,51±16,88 aB
60	0,41±0,05 bA	0,19±0,03 bA	0,15±0,01 bA
120	0,13±0,01 bA	0,18±0,01 bA	0,05±0,01 bA
180	0,29±0,024 bA	0,17±0,01 bA	0,23±0,04 bA
C.V(%)			
	IAA		
0	413,98±34,53 aA	66,11±17,19 aB	47,91±25,21 aB
60	2,86±0,63 bA	0,70±0,20 bA	0,75±0,06 bA
120	2,92±0,28 bA	0,89±0,28 bA	11,11±6,54 bA
180	3,85±3,42 bA	0,96±0,14 bA	1,82±1,32 bA
C.V(%)			
	Trans-zeatina		
0	30,94±28,44 aA	12,25±6,82 aB	11,11±4,39 aB
60	0,36±0,15 bA	0,09±0,03 bA	0,03±0,01 bA
120	0,05±0,01 bA	0,08±0,01 bA	0,06±0,01 bA
180	0,02±0,03 bA	2,88±4,89 bA	0,06±0,01 bA
C.V(%)	179,13		
	6-BA		
0	270,12±155,67 aA	87,12±56,74 aB	98,47±66,35 aB
60	0,05±0,01 bA	0,12±0,10 bA	0,03±0,01 bA
120	0,00±0,00 bA	3,13±0,25 bA	0,01±0,01 bA
180	0,47±0,42 bA	0,11±0,03 bA	0,09±0,02 bA
C.V(%)	134,48		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 11:** Perfil Hormonal (ng g<sup>-1</sup> MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 116 DAF (dias após a floração) com conteúdo de água de 35, 10 e 5% após 0, 60, 120 e 180 dias de armazenamento à -5°C.

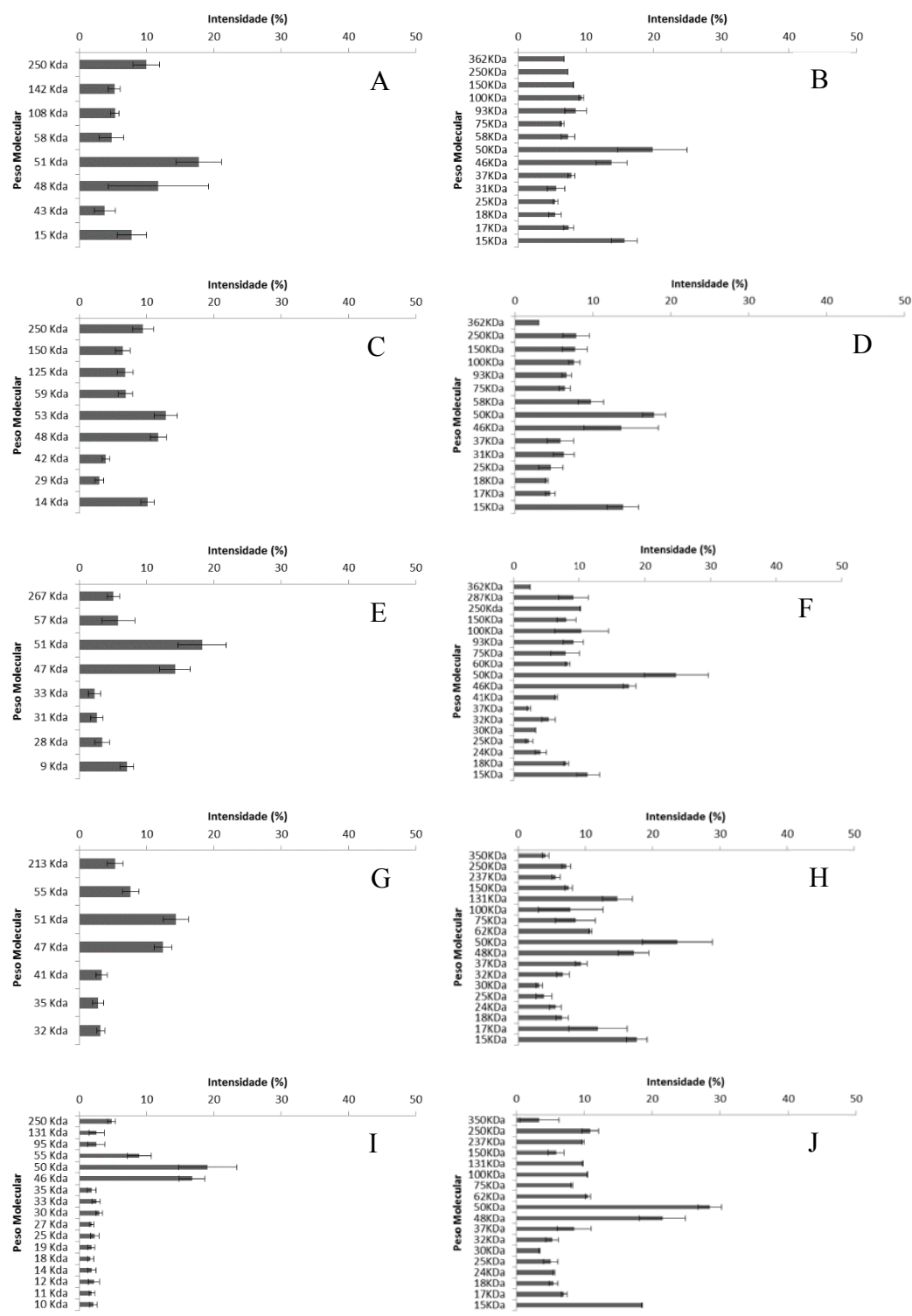
	35	10	5
	GA <sub>4</sub>		
0	14,70±1,83 aB	2712,98±45,77 aA	3,37±0,01 aB
60	0,00±0,00 bA	0,00±0,00 bA	0,05±0,01 aA
120	0,00±0,00 bA	0,04±0,01 bA	0,04±0,01 aA
180	0,00±0,00 bA	0,00±0,00 bA	0,00±0,00 aA
C.V(%)	58,64		
	ABA		
0	84,62±13,43 abA	96,26±6,38 aA	76,18±8,70 aA
60	60,82±11,50 abA	68,14±8,71 abA	68,37±2,62 aA
120	91,64±31,85 aA	42,44±3,20 bcB	49,38±21,77 aB
180	56,31±15,81 bA	17,18±1,37 cB	13,84±2,16 bB
C.V(%)	22,75		
	IAA		
0	65,03±18,25 aA	30,41±10,03 aB	29,72±13,72 aB
60	0,69±0,02 bA	0,00±0,00 bA	0,31±0,54 bA
120	2,10±0,42 bA	1,08±1,87 bA	0,33±0,57 bA
180	0,00±0,00 bA	6,82±2,04 bA	0,91±0,29 bA
C.V(%)	63,29		
	Trans-zeatina		
0	7,13±18,99	0,00±0,00	0,00±0,00
60	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
120	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
180	0,00±0,00	0,01±0,02	0,01±0,01
C.V(%)			
	6-BA		
0	2424,55±18,99 aA	597,68±14,86 aB	231,73±26,66 aB
60	0,63±0,48 bA	0,03±0,01 bA	1,35±0,61 bA
120	0,10±0,04 bA	0,65±0,06 bA	0,29±0,02 bA
180	0,09±0,03 bA	0,00±0,00 bA	0,00±0,00 bA
C.V(%)			

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 12:** Perfil Hormonal (ng g<sup>-1</sup> MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 133 DAF (dias após a floração) com conteúdo de água de 35, 10 e 5% após 0, 60, 120 e 180 dias de armazenamento à -5°C.

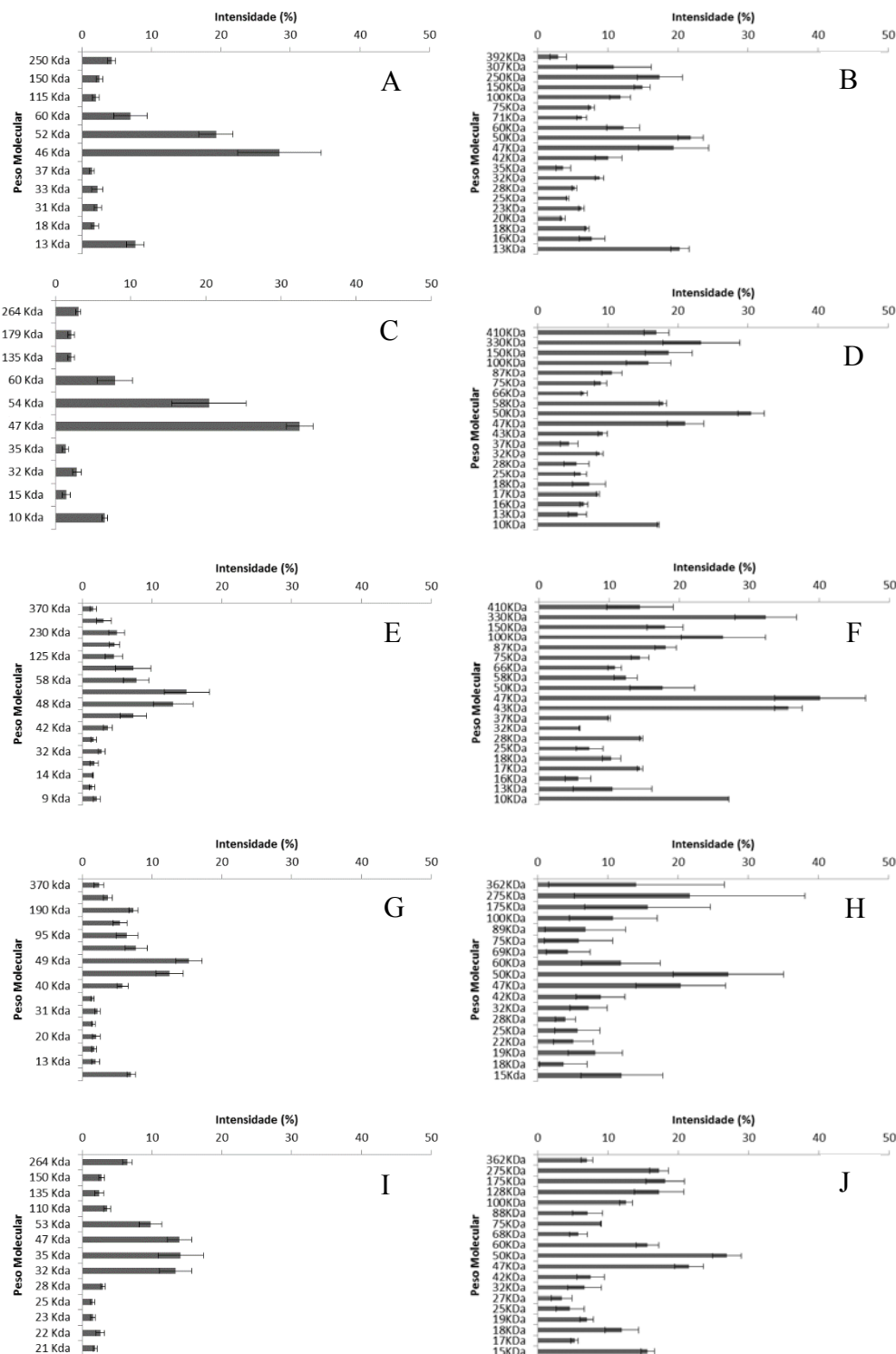
	27	10	5
	GA <sub>4</sub>		
0	0,000±0,00 bA	0,000±0,00 bA	0,000±0,00 aA
60	0,101±0,01 aA	0,085±0,04 aA	0,000±0,00 aB
120	0,000±0,00 bA	0,000±0,00 bA	0,000±0,00 aA
180	0,000±0,00 bA	0,000±0,00 bA	0,000±0,00 aA
C.V(%)	86,55		
	ABA		
0	49,323±11,62 bA	44,735±16,53 bA	24,453±9,26 aA
60	74,191±13,73 bA	72,865±6,98 aA	36,168±3,30 aB
120	115,091±23,04 aA	70,437±17,95 abB	28,143±4,80 aC
180	103,597±11,85 aA	52,894±3,18 abB	50,038±5,51 aB
C.V(%)	20,36		
	IAA		
0	432,712±26,85 aA	441,306±33,98 aA	408,757±14,24 aA
60	0,697±0,27 bA	0,000±0,00 bA	2,898±0,41 bA
120	0,347±0,33 bA	0,569±0,98 bA	2,101±1,20 bA
180	1,285±1,30 bA	3,105±0,60 bA	2,079±0,39 bA
C.V(%)	65,42		
	Trans-zeatina		
0	0,000±0,00	0,000±0,00	0,000±0,00
60	0,000±0,00	0,000±0,00	0,000±0,00
120	0,000±0,00	0,000±0,00	0,000±0,00
180	0,000±0,00	0,018±0,01	0,000±0,00
C.V(%)	86,55		
	6-BA		
0	44,848±31,05 aA	27,005±23,89 aAB	13,274±2,92 aB
60	1,248±0,17 bA	0,809±0,35 bA	0,000±0,00 bA
120	0,050±0,05 bA	0,017±0,03 bA	0,000±0,00 bA
180	0,102±0,03 bA	0,000±0,00 bA	0,000±0,00 bA
C.V(%)	86,55		

Médias seguidas da mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



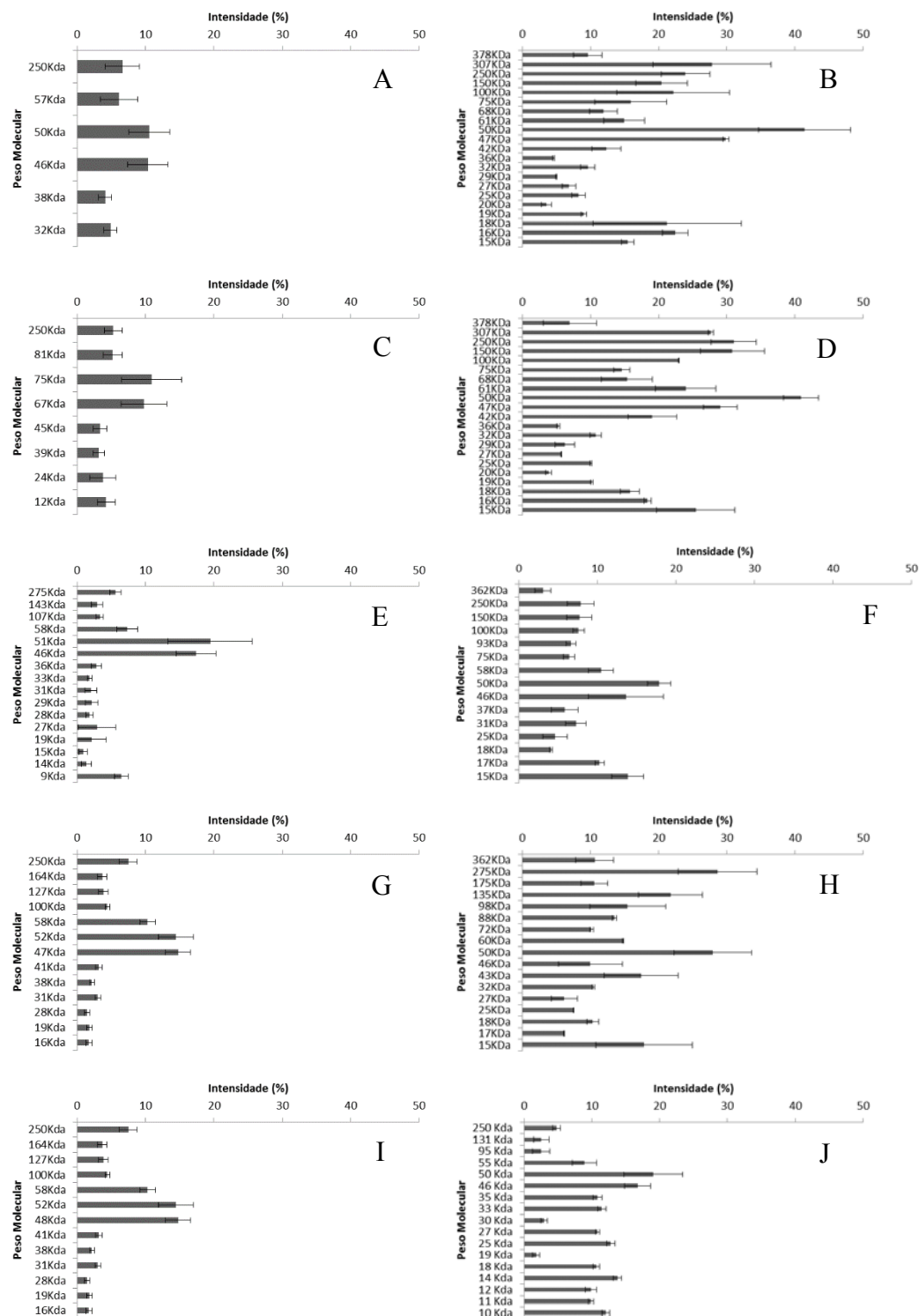
**Figura 1:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, aos 91 DAF (dias após a floração) armazenadas por 0 e 60 dias à  $-5^{\circ}\text{C}$ .

A: 59% de água sem armazenamento, B: 59% de água armazenadas por 60 dias, C: 20% de água sem armazenamento, D: 20% de água armazenadas por 60 dias, E: 15% de água sem armazenamento, F: 15% de água armazenadas por 60 dias, G: 10% de água sem armazenamento, H: 10% de água armazenadas por 60 dias, I: 5% de água sem armazenamento, J: 5% de água armazenadas por 60 dias.



**Figura 2:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, aos 91 DAF (dias após a floração) armazenadas por 0 e 60 dias à  $-5^{\circ}\text{C}$ .

A: 35% de água sem armazenamento, B: 35% de água armazenadas por 60 dias, C: 20% de água sem armazenamento, D: 20% de água armazenadas por 60 dias, E: 15% de água sem armazenamento, F: 15% de água armazenadas por 60 dias, G: 10% de água sem armazenamento, H: 10% de água armazenadas por 60 dias, I: 5% de água sem armazenamento, J: 5% de água armazenadas por 60 dias.



**Figura 3:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, aos 91 DAF (dias após a floração) armazenadas por 0 e 60 dias à  $-5^{\circ}\text{C}$ .

A: 27% de água sem armazenamento, B: 27% de água armazenadas por 60 dias, C: 20% de água sem armazenamento, D: 20% de água armazenadas por 60 dias, E: 15% de água sem armazenamento, F: 15% de água armazenadas por 60 dias, G: 10% de água sem armazenamento, H: 10% de água armazenadas por 60 dias, I: 5% de água sem armazenamento, J: 5% de água armazenadas por 60 dias.

## 7. CAPÍTULO 4

**GERMINABILIDADE DE SEMENTES DE *Annona emarginata*  
(SCHLTDL.) H. RAINER APÓS DIFERENTES NÍVEIS DE SECAGEM E  
APLICAÇÃO DE REGULADORES VEGETAIS DURANTE O  
DESENVOLVIMENTO<sup>7</sup>**

---

<sup>7</sup> Artigo nas normas do periódico: Journal of Experimental Botany.



## GERMINABILIDADE DE SEMENTES DE *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. RAINER APÓS DIFERENTES NÍVEIS DE SECAGEM E APLICAÇÃO DE REGULADORES VEGETAIS DURANTE O DESENVOLVIMENTO

Jaqueline Malagutti Corsato<sup>1\*</sup>; Gisela Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UNESP, Caixa Postal 510, Botucatu, CEP: 18608-970, São Paulo, Brasil. Email: [gisela.unesp@yahoo.com.br](mailto:gisela.unesp@yahoo.com.br)

\*Autor para correspondência. Email: [jaque\\_corsato@hotmail.com](mailto:jaque_corsato@hotmail.com), Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Caixa Postal 510, Botucatu, CEP: 18608-970, São Paulo, Brasil

**Resumo:** A espécie *A. emarginata* apresenta dormência após secagem o que têm dificultado seu manejo em viveiros de produção de mudas. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de reguladores vegetais na germinabilidade de sementes de *A. emarginata* ao longo do desenvolvimento quando submetidas a níveis de secagem. O experimento foi instalado com delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 4 (níveis de secagem x concentrações do regulador) totalizando 20 tratamentos com quatro repetições de 15 sementes por parcela. Em cada época de coleta (49, 91, 116 e 133 DAF) sementes apresentando teor de água inicial e reduzido para 20%, 15%, 10% e 5%, foram colocadas para germinar com os seguintes tratamentos: sem embebição prévia (SEP), embebidas em água destilada e em solução contendo 250 e 750 mg L<sup>-1</sup> dos reguladores GA<sub>4+7</sub> + N- (fenilmetil) – aminopurina. Foram avaliados porcentagem, tempo médio, índice de velocidade e sincronização da germinação; perfil de açúcares solúveis totais; atividade da peroxidase e superóxido dismutase; teores de lipoperóxido e proteínas LEA. Verificamos que as sementes não apresentam dormência, permitem secagem até 5% de água e a aplicação dos reguladores vegetais sincroniza e aumenta a velocidade de germinação. Concluímos que a germinabilidade das sementes de *A. emarginata* é alterada em função os níveis de secagem obtidos em casa fase do desenvolvimento e da aplicação dos reguladores vegetais.

**Palavras-chave:** desenvolvimento de sementes; tolerância à dessecação, proteínas LEA, lipoperóxido, SOD, POD.

## Introdução

A família Annonaceae é conhecida por apresentar germinação lenta e desuniforme, sendo várias as hipóteses para justificar esse comportamento germinativo (Ferreira et al., 2013).

Rizzini (1973) sugere que a dormência das sementes de Annonaceae é embrionária, pois as sementes seriam dispersas com o embrião imaturo. No entanto, Smet et al. (1999) relatam que as sementes são dispersas com embrião imaturo ou rudimentar, sendo necessário um período após a dispersão para que o embrião termine o seu crescimento. Por outro lado, há controvérsias quanto essa dormência morfológica uma vez que Esquinca et al. (1997) verificaram que sementes de *A. diversifolia* são dispersas com embrião completo, embora necessitem de um período de 6 meses de armazenamento para que germinem, o que sugere uma dormência fisiológica que pode ser superada pela aplicação de reguladores vegetais (Braga et al., 2010; Oliveira et al., 2010; Costa et al., 2011; Ferreira, 2011).

Neste contexto, vale ressaltar a necessidade de caracterizar a época adequada para as coletas de sementes pois, o estágio de desenvolvimento influencia diretamente na qualidade e potencial germinativo das mesmas (Linkies et al., 2010; Bewley et al., 2013). Assim, para que ocorra a germinação, é necessário que as sementes apresentem o embrião completamente formado e sem estabelecimento de dormência (Dias et al., 2011).

Ao longo do desenvolvimento das sementes há redução do conteúdo de água, sendo necessários mecanismos de proteção (sistemas antioxidantes, proteínas LEA e acúmulo de sacarose) para evitar os danos gerados pela a formação de radicais livres, os quais podem reagir com o sistema de membranas celulares, levando a danos irreversíveis e até mesmo à morte celular (Buitink e Leprince, 2008).

Esses mecanismos, presentes em sementes ortodoxas, irão manter a integridade das membranas permitindo que ocorra a secagem ao final do desenvolvimento. Com a redução do metabolismo devido a essa retirada de água, as sementes são dispersas em condições de germinar quando em ambiente favorável e/ou superados possíveis mecanismos de dormência (Rajjou e Debeaujon, 2008).

Há relatos de que as sementes da espécie *A. emarginata* (Schltdl.) H. Rainer (araticum-de-terra-fria) também apresentam dormência, principalmente após secagem o que têm dificultado seu manejo em viveiros de produção de mudas (Manica, 2003; Costa et al., 2011). A espécie apresenta grande interesse devido a sua compatibilidade

quando utilizada como portaenxerto para a atemóia (*Annona cherimola* Mill. X *Annona squamosa* L.) e cherimóia (*Annona cherimola* Mill.), além de potencial emprego em programas de melhoramento e na recuperação de áreas degradadas devido a sua rusticidade (Tokunaga, 2000; Scaloppi Junior, 2007; Kavati, 2013).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de reguladores vegetais na germinabilidade de sementes de *A. emarginata* ao longo do desenvolvimento quando submetidas a níveis de secagem.

### **Material e Métodos**

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Fisiologia da Germinação e Dormência de Sementes do Departamento de Botânica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, *campus* de Botucatu – SP.

Durante o período de floração das plantas de araticum-de-terra-fria (outubro de 2010 e outubro de 2011), foram marcadas matrizes no Núcleo de Produção de Mudanças da CATI (Coordenadoria de Assistência Técnica Integral), localizado em São Bento do Sapucaí – SP (22° 41'20" sul e a uma longitude 45° 43' 51" oeste, altitude de 886 metros). Foram determinadas cinco épocas de coleta: 49, 91, 116 e 133 DAF (Dias Após a Floração), as quais abrangeram do início do desenvolvimento, até a dispersão dos frutos, resultando em dois ciclos de avaliação, 2010/2011 e 2011/2012.

A determinação do teor de água inicial das sementes de *A. emarginata* foi realizada utilizando quatro repetições de 25 sementes por parcela. As sementes foram acondicionadas em estufa de secagem com circulação forçada de ar à temperatura de 103°C durante 17 horas (Ista, 2004). Os resultados do teor de água das sementes foram expressos em porcentagem (%), com base no peso úmido das sementes conforme a metodologia descrita pela Ista (2004).

Em cada época de coleta (49, 91, 116 e 133 DAF) as sementes extraídas dos frutos foram submetidas ao teste de germinação em esquema fatorial 5x4 (teores de água x concentrações dos reguladores), totalizando 20 tratamentos com quatro repetições de 15 sementes por parcela. Sementes apresentando teor de água inicial e reduzido para 20%, 15%, 10% e 5% em estufa de circulação forçada de ar à temperatura de 32°C, foram colocadas para germinar com os seguintes tratamentos: sem embebição prévia (SEP), embebidas em água destilada e em solução contendo 250 e 750 mg L<sup>-1</sup> dos reguladores GA<sub>4+7</sub> + N- (fenilmetil) - aminopurina (Corsato et al, 2012). A embebição foi sob aeração constante por 60 horas (Costa, 2009). Posteriormente, as sementes

foram acondicionadas em papel Germitest umedecido com água destilada na proporção de duas vezes e meia o peso do papel seco (Brasil, 2009).

Os tratamentos foram acondicionados em câmara de germinação com temperatura e fotoperíodo alternados, 20°C durante 18 horas de escuro e 30°C por seis horas de claro (Costa, 2009). As avaliações foram constituídas de contagem do número de sementes germinadas a cada dois dias, sendo considerado como germinada aquela que apresentou pelo menos 2 mm de raiz primária (Hadas, 1976). Foram calculadas as porcentagens, tempo médio (Edmond e Drapala, 1958), índice de velocidade (Silva e Nakagawa, 1995), frequência e sincronização da germinação (Laboriau e Agudo, 1987) e a porcentagem de plântulas normais (Brasil, 2009).

O delineamento experimental para as análises bioquímicas em cada época de coleta, descritas à seguir, foi em esquema fatorial 5x4 (níveis de secagem x concentrações do regulador). Para as análises, foram coletadas três repetições de 10 sementes por parcela, as quais foram previamente maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer à temperatura de -80°C até o momento das análises.

### **Açúcares solúveis**

Para a extração dos açúcares solúveis foram utilizados 100mg de material acondicionado em tubos eppendorf, onde foi adicionado 1mL de etanol 80% na proporção de 10:1. Os tubos foram incubados em banho a 80°C por 15 minutos (Dubois et al., 1956). Após incubação, o material foi centrifugado a 12000rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para tubos com capacidade de 5mL. O mesmo procedimento foi repetido duas vezes com o substrato restante e o volume final do extrato foi ajustado para 3mL. A união dos três sobrenadantes resultou no extrato com a fração de açúcares solúveis que foi analisada.

Após a extração do material foi realizada a determinação dos açúcares solúveis totais pelo método do fenol sulfúrico (Dubois et al., 1956). Para a purificação das amostras foi utilizado 1ml de amostra, a qual passou em resina catiônica e aniônica. O pH das amostras foi corrigido com hidróxido de amônio e ácido clorídrico e, posteriormente, estas foram armazenadas em freezer (Garcia et al., 2006). As amostras foram liofilizadas e suspendidas em 1ml de água deionizada.

Os açúcares solúveis foram analisado através de cromatografia líquida de alta resolução em cromatógrafo DIONEX, modelo ICS3000, em coluna CarboPac PA-1. O sistema de eluição foi o isocrático com 250 mM de hidróxido de sódio (eluente B) em

água (eluente A), com fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>, por meio da seguinte programação: 0-2 min, 7% eluente B; 2,1-25 min, 4% eluente B; 25,1-30 min, 80% eluente B; 30,1-35 min, 7% eluente B (Garcia et al. 2006).

### **Proteínas solúveis totais**

Para a extração das proteínas solúveis totais foi seguida a metodologia de Kar e Mishra (1976). Foram utilizados 600mg de material triturado em nitrogênio líquido homogeneizados com a auxílio de um almofariz em 5mL de tampão de extração fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,8. O macerado centrifugado à 12000 rpm por 40 minutos. A determinação das proteínas solúveis totais foi realizada pelo método de Bradford (1976).

### **Atividade da enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)**

A atividade da peroxidase foi determinada de acordo com as condições citadas no trabalho de Teisseire e Guy (2000). O sistema de reação foi composto de 100 uL de extrato enzimático diluído no tampão de extração; tampão fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 6,5; pirogalol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol.L<sup>-1</sup> e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 5 mmol L<sup>-1</sup>. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 5 minutos e resulta na formação de purpurugalina, a qual foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 430nm e seu coeficiente de extinção molar (2,47 mmol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em umol de purpurugalina min<sup>-1</sup> de proteína.

### **Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)**

A atividade da SOD foi realizada pelo método de Beauchamp e Fridovich (1971), citados por Bor et al. (2003). O sistema de reação é foi composto de 30µL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 7,8, mistura “nitrobluetetrazolium” (NBT) 33 µmol L<sup>-1</sup> + EDTA 0,66 mmol L<sup>-1</sup> (5:4) e mistura L-metionina 10 mmol L<sup>-1</sup> + riboflavina 3,3 mol L<sup>-1</sup> (1:1), totalizando um volume de 3,0mL. Após iluminação dos tubos por 5 minutos a 25°C, a redução do NBT a “blue formazan” foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 560 nm. A atividade da SOD foi expressa em U mg<sup>-1</sup> de proteína.

### **Teores de lipoperóxido**

Os níveis de peroxidação de lipídeos foram avaliados utilizando a metodologia de Heath e Packer (1968). Para isso, foram utilizados 100mg de material o qual foi macerado em almofariz adicionando-se 2ml de um meio de reação constituído por ácido tiobarbitúrico (0,25%, m/v) e ácido tricloro acético (10%, m/v). A solução foi acondicionada em tubos de ensaio vedados e incubados em banho-maria a 95°C por 1 hora. A solução resultante foi centrifugada a 12000 rpm por 40 minutos a 25°C. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda 532 e 600nm. O montante de malondialdeído (MDA) formado foi calculado utilizando um coeficiente de extinção de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### **Resultados**

Os dois ciclos estudados (outubro de 2010 e outubro de 2011) apresentaram o mesmo padrão de resposta, por esse motivo os resultados apresentados à seguir refere-se apenas ao ciclo referente à outubro de 2010 até fevereiro de 2011.

As sementes coletadas aos 49 DAF apresentaram elevada divisão celular (Figura 1A), e a partir de 91 DAF observa-se embriões com cotilédones e eixo diferenciados (Figura 1B). As sementes aos 91 DAF e sem embebição prévia, mantém a germinação elevada com secagem de 20% e 15% de água (70 e 73% respectivamente) e queda significativa quando secas até 10 e 5% (15 e 20% de germinação respectivamente). Aos 91 DAF a embebição da sementes em soluções contendo reguladores não aumentou a germinação (Tabela 1).

Sementes com 116 DAF, permitiram secagem até 5%, mantendo a germinação entre 75 a 80% quando colocadas para germinar sem embebição prévia. Nesta fase a combinação entre a secagem e aplicação de GA<sub>4+7</sub>+CK permitiu incrementos na germinação, conforme observado com sementes com teor de água de 20% e a aplicação de 250 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>4+7</sub>+CK, resultando em 97% de germinação. No entanto, sementes que tiveram o conteúdo de água reduzido para 15 e 10% seguidas de embebição em 750 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>4+7</sub>+CK tiveram a germinação reduzida (Tabela 1).

Aos 133 DAF, verificamos que há redução na porcentagem de germinação quando as são sementes secas até 5% e imersas em água. Neste caso, o fato das sementes estarem com baixo teor de água (5%) e serem imersas em água provocou maior velocidade de embebição o que pode ter resultado em danos físicos na membrana

e consequente redução da germinação (Tabela 1). No entanto, a inclusão dos reguladores na solução de imersão evitou a redução da germinação.

Observamos também que sementes com teor de água reduzido e imersas em 750 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>4+7</sub>+CK responderam de modo distinto em relação à seu estado de desenvolvimento. Sementes mais jovens (91 DAF), alcançaram 15% de germinação quando secas a 10% e 17% de germinação quando secas a 5%. Já as sementes com 133 DAF, mais maduras passam a responder a aplicação dos reguladores com elevadas % de germinação até quando submetidas aos menores níveis de secagem (Tabela 1).

Os resultados também mostraram que a aplicação exógena de reguladores vegetais, tendem a sincronizar e reduzir o tempo do processo de germinação (Tabelas 2 e 3, Figuras 2 até 16). Em sementes aos 91 DAF e com teor de água inicial (59%) a aplicação dos reguladores vegetais reduziu o TMG e incrementou o IVG das sementes e as sementes que apresentavam 10% de água quando embebidas em água e nos reguladores tiveram o TMG reduzido (Tabelas 2 e 3).

Aos 116 DAF, sementes que tiveram o teor de água reduzido para 20, 15 e 5% de água seguida da aplicação dos reguladores vegetais também reduziram o TMG e incrementaram o IVG (Tabelas 2 e 3), fato este que auxilia na sincronização da germinação dessa espécie como observado com a aplicação dos reguladores vegetais nas Figuras 2 até a 16.

Os maiores incrementos nas variáveis de germinação estão relacionados com a degradação de açúcares solúveis totais, tanto aos 116 DAF como aos 133 DAF até secagem de 15% com a imersão das sementes em água ou nos reguladores (Tabela 4). No entanto, quando a imersão é feita em 750 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>4+7</sub>+CK há um aumento nos níveis de açúcares solúveis totais, o que pode ter ocorrido devido a degradação de lipídeos. Já as sementes secas à 10% e 5% não apresentam variações nos níveis de açúcares independentes de serem embebidas ou não (Tabela 2).

A capacidade das sementes germinarem após a instalação de estresses causados pela redução de água e pela posterior embebição, em água ou nos reguladores, está relacionada à associação de sistemas de proteção de membranas, a fim de garantir o processo germinativo.

A POD e a SOD não apresentaram atividades significativas que justificassem as reduções nos teores de lipoperóxido observados à medida em que aumentavam os níveis de secagem nas sementes (Tabelas 5, 6 e 7). Ou seja, ao longo do desenvolvimento, quando as sementes alcançaram 116 e 133 DAF, verificamos que a secagem reduziu os

níveis de peroxidação, indicando a atuação de sistemas de proteção às membranas, não relacionados à atividade da POD e da SOD. No entanto, apesar da redução nos teores de lipoperóxido a germinação foi reduzida, principalmente nas sementes submetidas aos menores níveis de secagem (10 e 5%) e que não foram tratadas com os reguladores (Tabela 1).

Associado ao sistema antioxidante, proteínas da embriogênese tardia (LEA) e açúcares solúveis podem ter auxiliado na proteção das membranas, o que refletiu na redução dos teores de lipoperóxido. Verificamos que a medida que as sementes foram se desenvolvendo houve um aumento das bandas de proteínas LEA em número e intensidade assim como quando as sementes são secas (Figuras 17, 18 e 19).

Em relação ao perfil de açúcares solúveis, verificamos que sementes próximas à dispersão (116 DAF) que foram secas à 15% de água e embebidas em 750 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>4+7</sub>+CK e aquelas secas até 10% de água seguidas de embebição em água tiveram seus níveis de glicose aumentados. Sementes com 15% de água embebidas em 0 e 250 mg L<sup>-1</sup> dos reguladores reduziram os níveis de frutose assim como as que apresentavam 15% de água embebidas água reduziram o conteúdo de sacarose (Tabela 9). Já aos 133 DAF observamos que a embebição das sementes levou a um decréscimo nos níveis de sacarose (Tabela 10).

### **Discussão**

A germinabilidade das sementes de *A. emarginata* está relacionada com a sua maturação, sendo que não foi encontrada dormência na espécie (Tabela 1). Embora a família Annonaceae seja conhecida por apresentar dormência definida ora como morfológica (Rizzini, 1973) e ora fisiológica ou morfofisiológica (Silva et al., 2007), o que verificamos foi que, se a coleta for realizada com sementes imaturas e com embrião ainda indiferenciado, não há como ocorrer germinação, conforme observado aos 49 DAF (Figura 1) (Linkies et al., 2010; Dias et al., 2011)

Neste caso a presença de células indiferenciadas nas sementes de *A. emarginata* aos 49 DAF está relacionada ao estágio de desenvolvimento e não a dormência morfológica, previamente mencionada de modo geral para as espécies da família Annonaceae (Smet et al., 1999; Ferreira et al., 2013).

A partir do momento que as sementes germinaram, o que foi observado aos 91 DAF, a redução no conteúdo de água das sementes de *A. emarginata* poderia ter levado à uma dormência secundária, devido a possíveis aumentos na concentração de



inibidores da germinação durante a secagem, conforme proposto por Costa et al. (2011). No entanto, a secagem somente reduziu a germinação quando as sementes ainda não estavam totalmente desenvolvidas (91 DAF) (Tabela 1).

Verificamos que dependendo do teor de água das sementes há diferentes respostas à aplicação dos reguladores vegetais, sendo o maior efeito dos reguladores observado quando as sementes estavam mais maduras (116 e 133 DAF) (Tabela 1). A alteração do balanço entre promotores e inibidores da germinação pode resultar na superação de dormência assim como, incrementar a germinação em sementes não dormentes, reduzir o tempo médio e proporcionar a sincronização da germinação, levando a produção de mudas de alta qualidade em menor espaço de tempo (Rajjou et al., 2011).

Neste experimento, a aplicação dos reguladores permitiu uma maior velocidade de germinação em função da sua ação na degradação de reservas (Bewley et al., 2013) o que fica claro com a redução no conteúdo de açúcares solúveis (Tabela 2). Da mesma forma também foi observado incremento na germinação de sementes não dormentes de outra Annonaceae (*Annona cherimolla* Mill.), com a aplicação de ácido giberélico (Campbell e Popeone, 1969; Agustín e Alviter, 1996).

Com a secagem até níveis muito reduzidos (5%) e com o desenvolvimento das sementes a redução nos teores de lipoperóxido indica que não ocorreram danos oxidativos nas membranas (Tabelas 5, 6 e 7). No entanto, era esperado que quanto maior o nível de estresse, maior seria a concentração dos teores de lipoperóxido, devido a peroxidação dos lipídeos que ocorre em função dos radicais livres. O fato das sementes de *A. emarginata* terem reduzido a concentração do lipoperóxido significa que há algum outro sistema evitando a peroxidação (Donadon et al., 2013; Hand et al., 2011).

Neste contexto, observamos nas sementes de *A. emarginata* a presença de proteínas LEA com pesos moleculares na faixa de 70 à 25 KDA (Figuras 17, 18 e 19), essas proteínas podem ter sido as responsáveis por essa proteção, uma vez que estas proteínas nesta faixa de peso molecular, possuem característica de moléculas osmoprotetoras (Tunacliffe e Wise, 2007), resultando na habilidade de proteger os componentes intracelulares, assim como alguns açúcares (sacarose) os quais também são encontrados nas sementes de *A. emarginata* (Barbedo et al., 2013).

Apesar da possível atuação em conjunto desses sistemas de proteção da membrana, nas sementes submetidas à secagem, nos menores teores de água (5%)

observamos reduções da porcentagem de germinação (Tabela 1). No entanto, quando as sementes são imersas nas soluções contendo os reguladores não são observadas reduções na germinação, o que sugere um efeito direto no processo germinativo ou uma ação associada desses reguladores ao sistema de proteção de membranas que deve ser estudado.

### **Conclusão**

Concluimos que a germinabilidade das sementes de *A. emarginata* é alterada em função os níveis de secagem obtidos em casa fase do desenvolvimento e da aplicação dos reguladores vegetais.

### **Referências<sup>8</sup>**

AGUSTÍN, J.A.; ALVITER, A.R. 1996. El cultivo de la cherimoya (*Annona cherimolla* Mill.) em el estado de Michoacán. (Spanish). Universidade Autónoma de Chapingo (UAC). Chapingo, México, 61p.

BARBEDO, C.J.; CENTENO, D. da. C.; RIBEIRO, R. de. C.L.F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, v.40, n.4, p.583-593, 2013.

BEAUCHAMP C., FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal Biochem.**, v.44, n.1, p.276-87, 1971.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3 ed. New York: Springer, 2013. 392p.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254.

BRAGA, J.F. et al. Germination of atemoya (*Annona cherimolla* Mill. X *A. squamosa* L.) CV. Gefner seeds subject to treatments with plant growth regulators. **International Journal of Science and Nature**, v.1, n.2, p. 120-126, 2010.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regra de Análise de Sementes**. Brasília: departamento de produção vegetal, 2009, 398p.

BUITINK, J., LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **C. R. Biologies**, v,331, p.788–795, 2008.

---

<sup>8</sup> Referências nas normas da ABNT

CAMPBELL, C.W.; POPENOE, J. Effect of gibberellic acid on seed dormancy of *Annona diversifolia* Saff. **Tropical Region America sociedade Horticultural Service**, v.11, p. 31-36, 1968.

CORSATO, J.M.; FERREIRA, G.; BARBEDO, C.J. Desiccation tolerance in seeds of *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer and action of plant growth regulators on germination. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.4, n.24, p.253-260, 2012.

COSTA, P.N. **Reguladores vegetais, luz e temperatura na germinação de sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer)**. 2009. 78p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

COSTA, P.N.; BUENO, S.S.C.; FERREIRA, G. Fases da germinação de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1, p.253-260, 2011.

DONADON, J.R.; RESENDE, O.; TEIXEIRA, S.P.; JAIME MAIA DOS SANTOS, J.M.; MORO, F.V. Effect of Hot Air Drying on Ultrastructure of Crambe Seeds. **Drying Technology**, v. 31, p. 269–276, 2013.

DUBOIS, M. GILLES, K. A. , HAMILTON, J. K. , REBERS, P. A. , SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EDMOND, J. B.; DRAPALLA, W. J. . The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, v.71, p.428-443, 1958.

FERREIRA, G. **Reguladores vegetais na superação da dormência, balanço hormonal e degradação de reservas em sementes de *Annona diversifolia* Saff. E *A. purpurea* Moc & Sessé ex Dunal (Annonaceae)**. 2011. 101p. Tese (Livre-Docência). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FERREIRA, G.; GIMENEZ, J.; CORSATO, J.M.; OLIVEIRA, M.C. de. Germinação de sementes de Anonáceas. In: FERREIRA, G.; KAVATI, R.; BOARO, C.S.F.; FERRARI, T.B.; LEONEL, S. Anonáceas: Propagação e Produção de Mudas. Botucatu, editora FEPAF, 2013.

GARCIA, I.S.; SOUZA, A.; BARBEDO, C.J.; DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Biology** v.66, p.739-745, 2006.

HADAS, A. Water uptake germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.27, 1976.

HAND, S.C.; MENZE, M.A.; TONER, M.; BOSWELL, L.; MOORE, D. LEA Proteins During Water Stress: Not Just for Plants Anymore. **Annu. Rev. Physiol.**, v.73, p.115–34, 2011.

HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.125, p.189-98, 1968.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. In: ISTA. **International Rules for Seed Testing**. Bassersdorf: ISTA, 2004. p.5.1- 5.5; 5A.1- 5A.50.

KAVATI, R. Porta-enxertos em anonáceas. In: FERREIRA, G.; KAVATI, R.; BOARO, C.S.F.; FERRARI, T.B.; LEONEL, S. Anonáceas: Propagação e Produção de Mudanças. Botucatu, editora FEPAF, 2013.

LINKIES, A., GRAEBER, K., KNIGHT, C., LEUBRER-METZGER, G. The evolution of seeds. **New Phytologist**, v.186, p.817-831, 2010.

LABOURIAU, L.G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *S. hispanica* L. 1. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.59, n.1, p.37-56, 1987.

SCALOPPI JUNIOR, E.J. propagação de espécies de *Annonaceae* com estacas caulinares. 92p. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Agrônomicas e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SILVA, J.B.; NAKAGAWA, J. Estudos de fórmulas para cálculo de velocidade de germinação. **Informativo Abrates**, v.5, p.62-73, 1995.

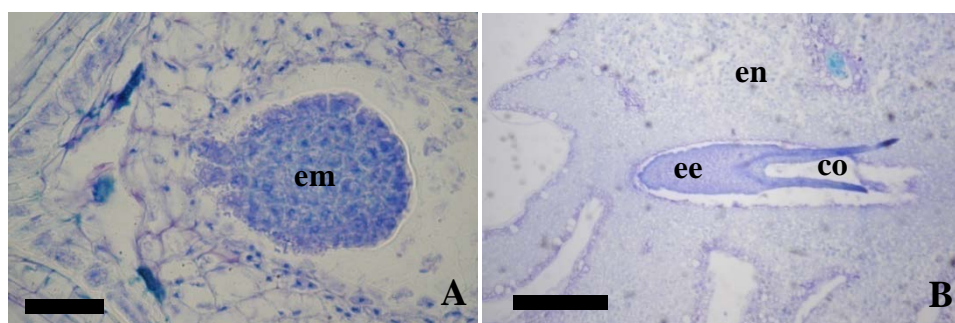
SMET, S. DE; DAMME, P. VAN; SCHELDEMAN, X.; ROMERO, J. Seed structure and germination of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). **Acta Horticulturae**, Wageningen, n.497, p.269-278, 1999.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, Amsterdam, v. 153, p. 65-72, 2000.

TOKUNAGA, T.A Cultura da atemoia. Campinas –SP: CATI, 2000. Boletim Técnico, 223, 80p.

RAJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **C. R. Biologies**, n.331, p.796–805, 2008.

RIZZINI, C.T. Dormancy in seeds of *Annona crassiflora* Mart. **Journal of Experimental Botany**, v.24, n.78, p.117-123, 1973.



**Figura 1:** Semente de *Annona emarginata*. 49 DAF (dias após a floração). A. Embrião. 116 DAF B. Endosperma e embrião. Barra de escala=50µm (A) 100µm (B)  
em: embrião; en: endosperma; ee: eixo embrionário; co: cotilédone

**Tabela 1:** Germinação [G(%)] das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF submetidas a níveis de secagem e concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.

	SEP	0 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	250 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	750 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK
91 DAF				
59%	77 aA	52 aAB	48 aB	63 abAB
20%	70 aA	53 aAB	43 aB	68 aAB
15%	73 aA	50 aAB	48 aAB	40 bcB
10%	15 bA	3 bA	15 bA	15 cA
5%	25 bA	10 bA	8 bA	17 cA
C.V (%)	33,87			
116 DAF				
35%	75 aA	72 aA	85 aA	85 aA
20%	57 aB	80 aAB	97 aA	90 aA
15%	80 aA	65 aAB	77 aA	45 bB
10%	80 aA	75 aA	75 aA	27 bB
5%	70 aA	32 bB	80 aA	75 aA
C.V (%)	18,34			
133 DAF				
27%	82 aA	80 aA	77 aA	88 aA
20%	88 aA	62 abB	78 aAB	85 aA
15%	72 aA	73 abA	75 aA	80 aA
10%	50 bB	70 abA	71 aA	68 aAB
5%	70 abA	58 bA	60 aA	72 aA
C.V (%)	14,58			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 2:** Tempo médio de germinação [TMG (dias)] das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem e concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.

	SEP	0 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	250 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	750 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK
91 DAF				
59%	32,58 aAB	38,03 aA	18,09 aC	22,46 aBC
20%	21,57 aA	24,33 bA	16,96 aA	20,10 aA
15%	26,72 aAB	31,40 abA	17,05 aB	19,28 aAB
10%	24,25 aA	9,5 cB	15,50 aAB	18,12 aAB
5%	27,66 aA	22,00 bcAB	14,75 aB	15,66 aAB
C.V (%)	30,76			
116 DAF				
35%	36,46 aA	29,87 bA	33,84 aA	32,65 abA
20%	35,85 aA	39,33 aA	19,30 cB	25,22 cdB
15%	32,54 aAB	33,55 abA	25,04 bcBC	22,30 dC
10%	34,92 aA	28,52 bA	28,27 abA	35,5 aA
5%	31,04 aAB	35,75 abA	23,67 bc B	27,95 abcAB
C.V (%)	13,92			
133 DAF				
27%	25,27 aA	23,73 abA	22,09 abA	21,07 aA
20%	13,64 abB	31,83 aA	8,90 bB	7,58 bB
15%	18,67 abA	13,22 bA	9,28 abA	7,40 bA
10%	11,73 bA	11,33bA	9,29 abA	7,76 bA
5%	7,45 bA	11,12 bA	16,37 abA	19,31 abA
C.V (%)	44,06			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 3:** Índice de Velocidade de Germinação das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem e concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.

	SEP	0 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	250 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	750 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK
91 DAF				
59%	16,69 bcB	6,82 aB	39,56 aA	32,88 aA
20%	37,01 aA	8,63 aC	22,30 bB	25,99 aAB
15%	21,95 bA	7,86 aB	18,75 bcAB	10,42 bAB
10%	6,88 cA	2,38 aA	2,40 dA	4,34 bA
5%	10,94 bcA	4,53 aA	5,01 cdA	2,75 bA
C.V (%)	49,13			
116 DAF				
35%	9,93 aA	16,00 aA	7,11 bA	9,40 aA
20%	9,88 aB	6,19 aB	37,94 aA	17,57 aB
15%	19,20 aA	8,64 aA	14,14 bA	7,88 aA
10%	15,76 aA	13,54 aA	8,15 bA	3,80 aA
5%	19,77 aA	3,94 aB	12,20 bAB	8,98 aAB
C.V (%)	60,62			
133 DAF				
27%	7,69 aAB	6,07 aB	10,34 bAB	19,01 aA
20%	10,88 aAB	3,43 aB	9,68 abA	7,94 aA
15%	4,64 aB	2,41 aB	17,39 abA	14,02 aAB
10%	2,65 aA	3,29 aA	14,05 abA	15,19 aA
5%	5,51 aB	9,38 aB	24,15 aA	23,18 aA
C.V (%)	58,5			

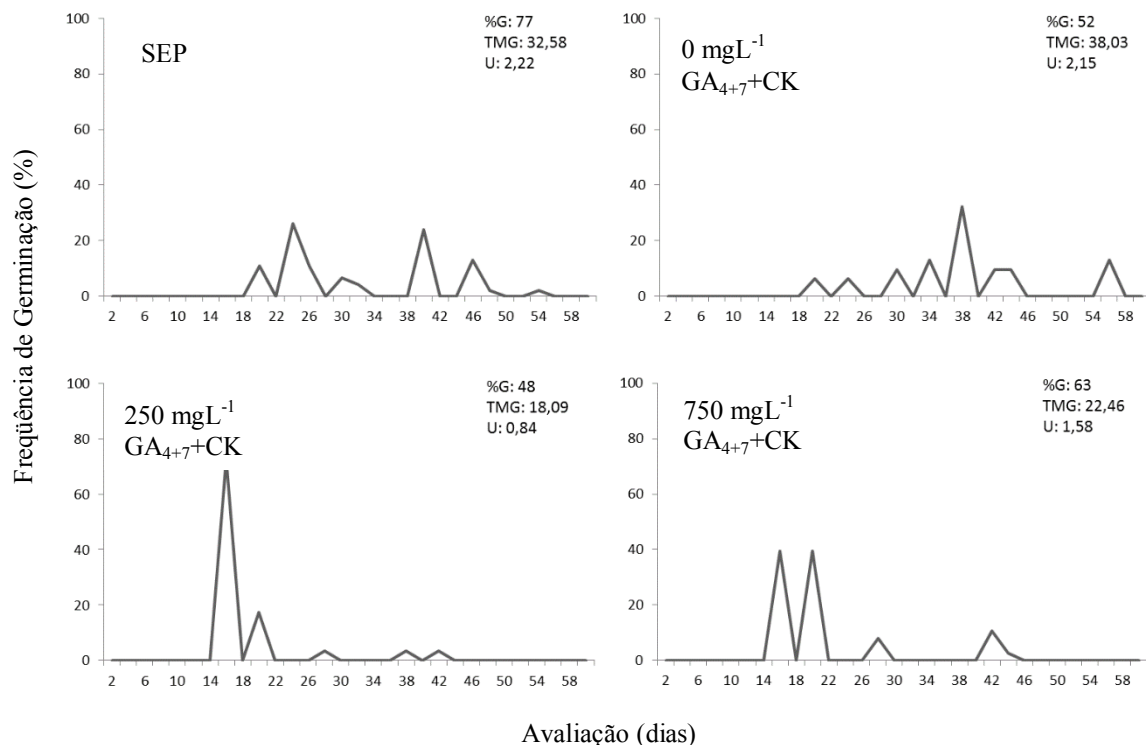
Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 2:** Conteúdo de açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF (dias após a embebição) submetidas a níveis de secagem e concentrações de  $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$ .

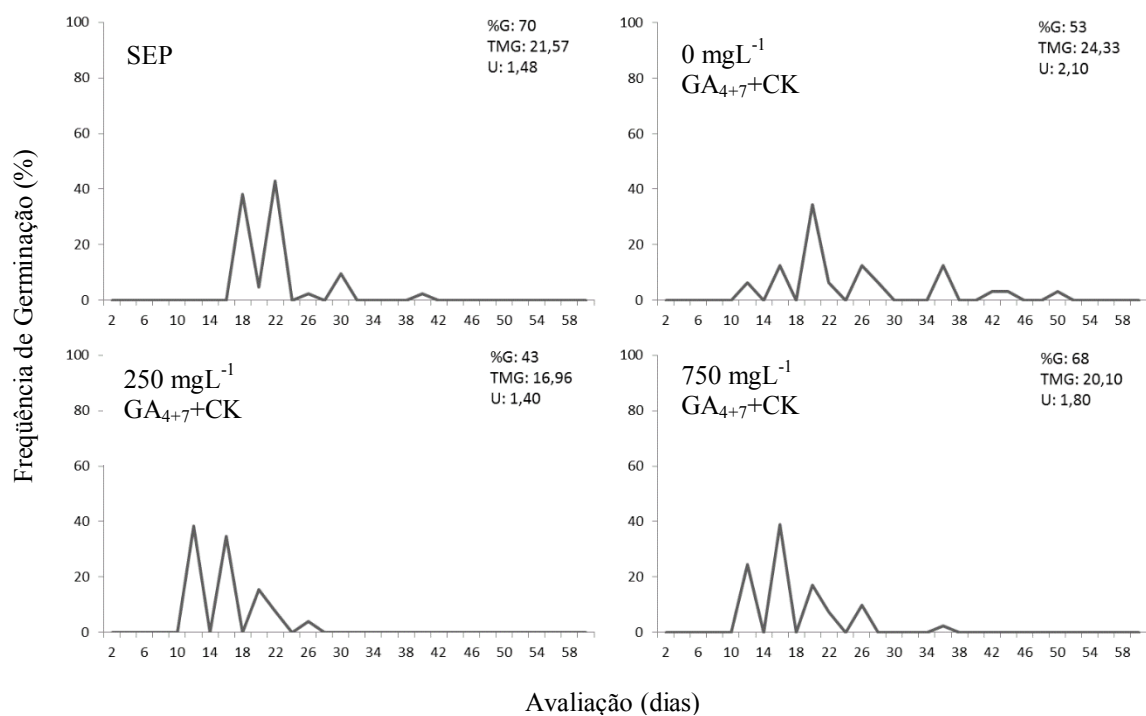
	SEP	$0 \text{ mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	$250 \text{ mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	$750 \text{ mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$
91 DAF				
59%	13,48 cC	16,87 aBC	19,85 aB	24,74 aA
20%	17,89 cA	10,35 bBC	8,66 bC	13,90 cAB
15%	24,83 bA	15,05 abBC	11,33 bC	17,34 bcB
10%	37,06 aA	17,68 aB	22,19 aB	19,97 abB
5%	29,21 bA	14,90 abB	17,63 aB	24,44 aA
116 DAF				
35%	29,49 aA	25,13 aAB	19,99 aB	26,35 aAB
20%	29,92 aA	22,34 abB	22,25 aB	26,19 aAB
15%	27,29 aA	17,65 bB	19,66 aB	23,93 abAB
10%	29,39 aA	18,72 abB	21,59 aB	18,14 bB
5%	18,55 bA	10,24 cB	15,45 aAB	17,77 bA
133 DAF				
27%	14,00 bAB	12,11 aB	16,46 aA	11,77 bB
20%	18,52 aA	8,47 abB	8,41 bB	16,86 aA
15%	16,35 abA	9,90 ab C	12,21 abBC	16,24 aAB
10%	12,06 bA	7,26 bB	11,59 bA	11,57 bA
5%	14,09 bA	11,79 aA	11,19 bA	12,92 abA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

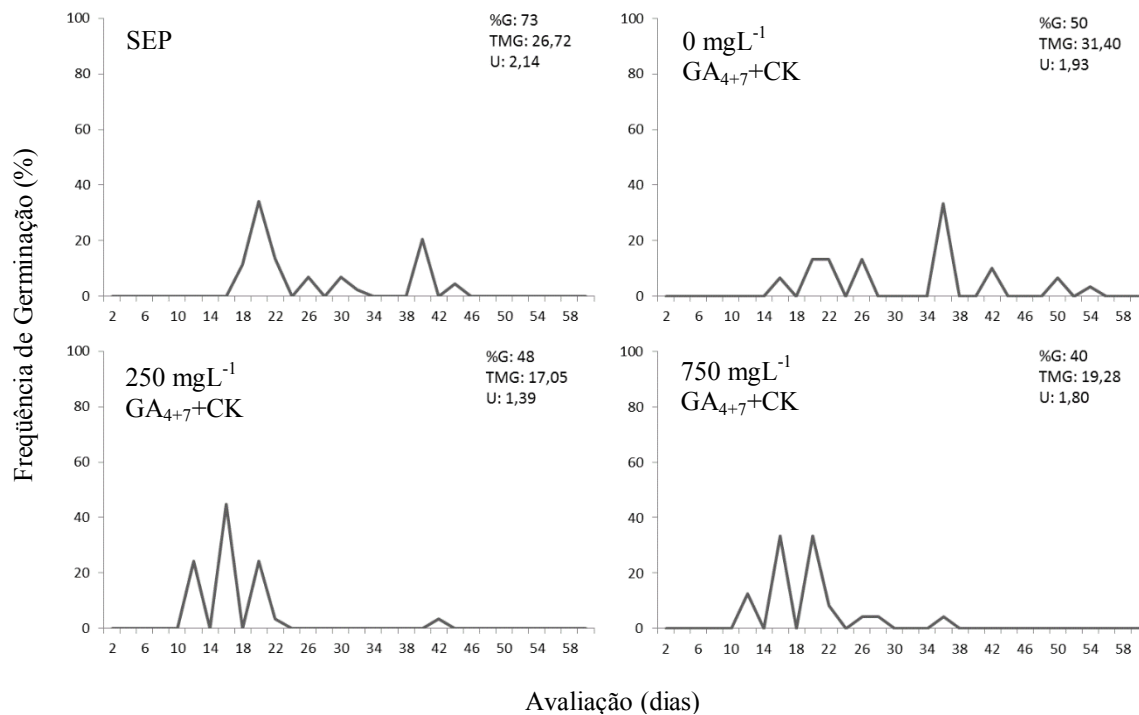




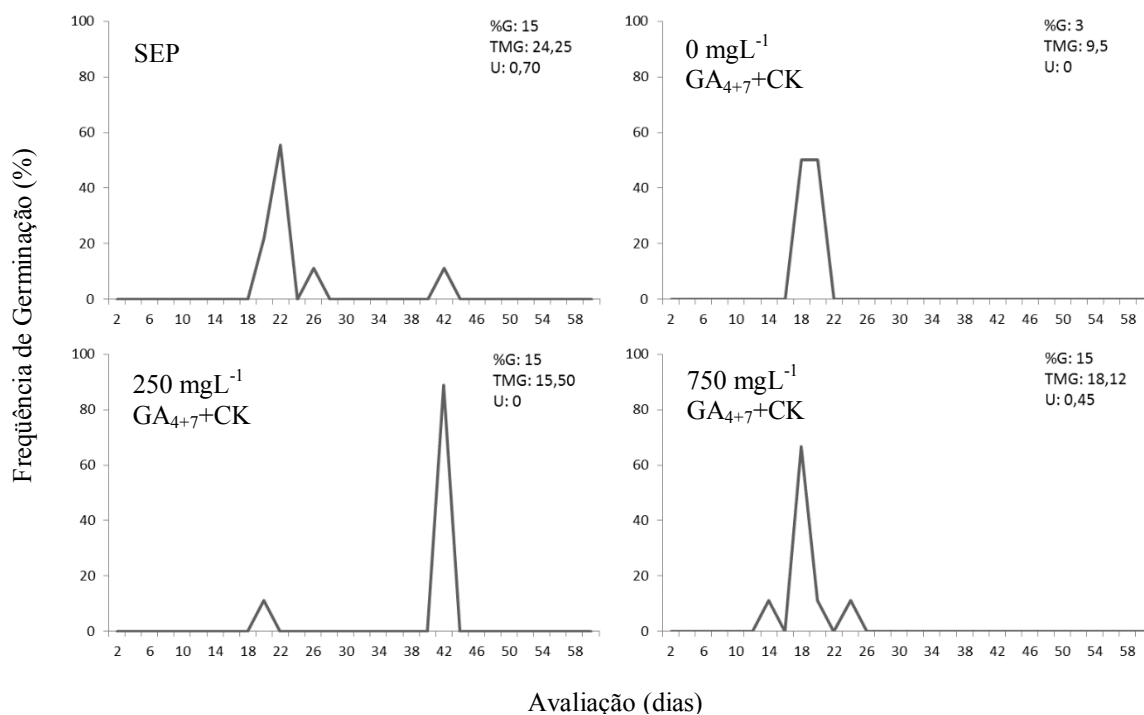
**Figura 2:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 91 DAF (dias após a floração) com 59% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



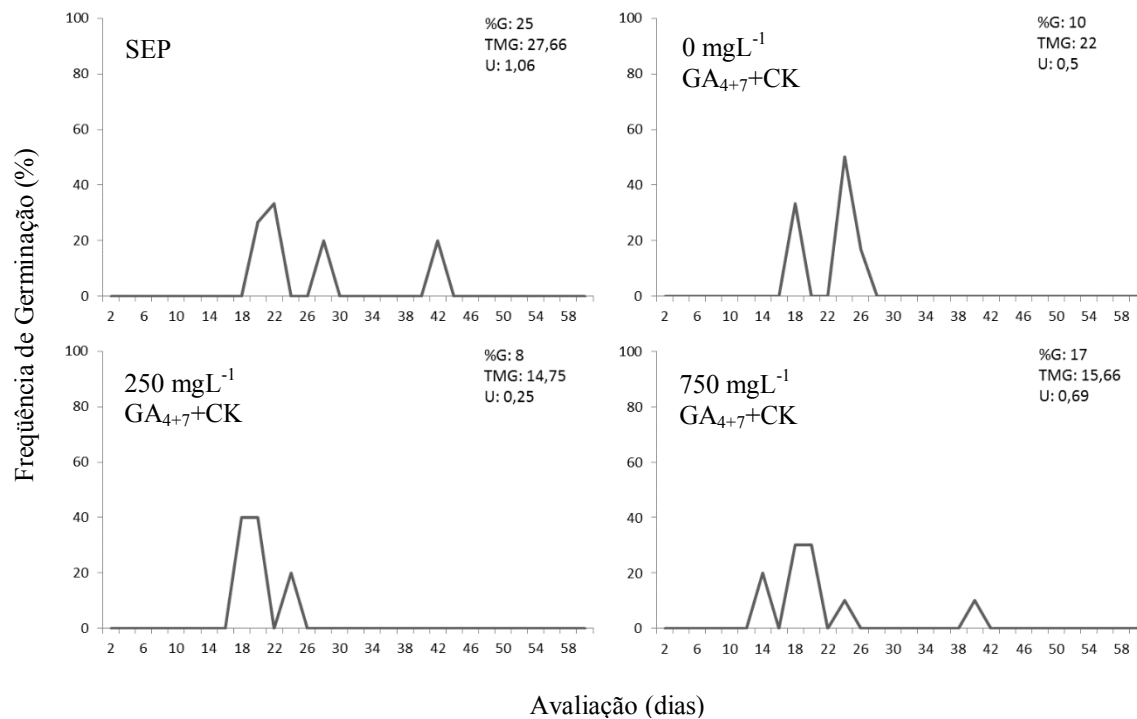
**Figura 3:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 91 DAF (dias após a floração) com 20% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



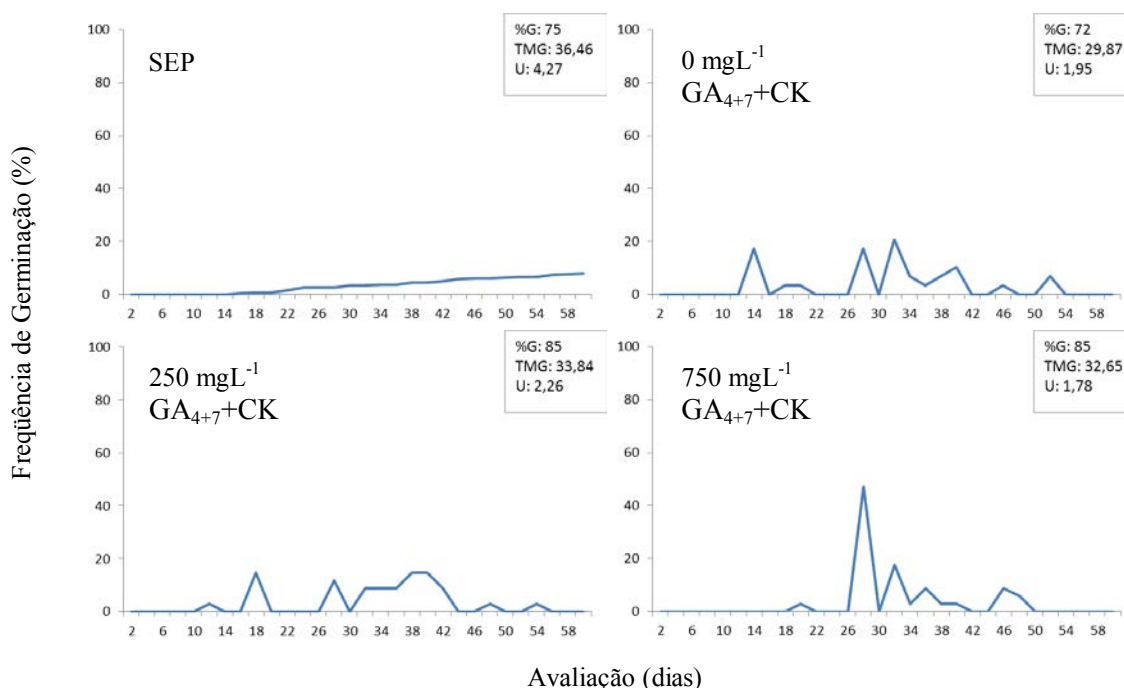
**Figura 4:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 91 DAF (dias após a floração) com 15% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



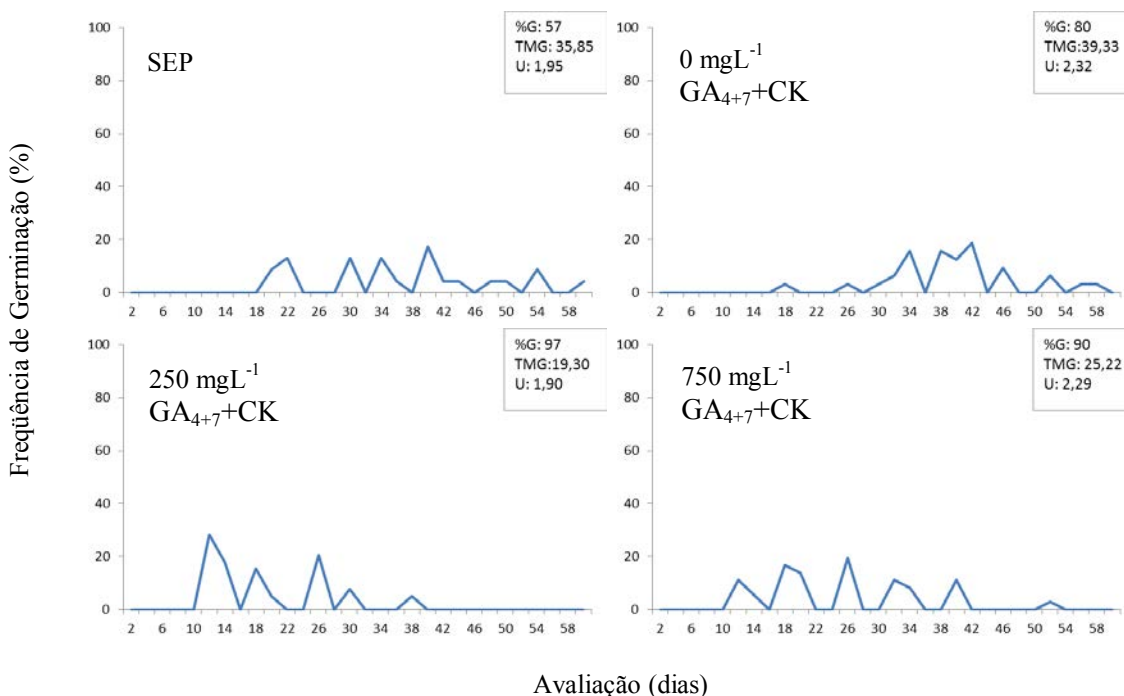
**Figura 5:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 91 DAF (dias após a floração) com 10% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



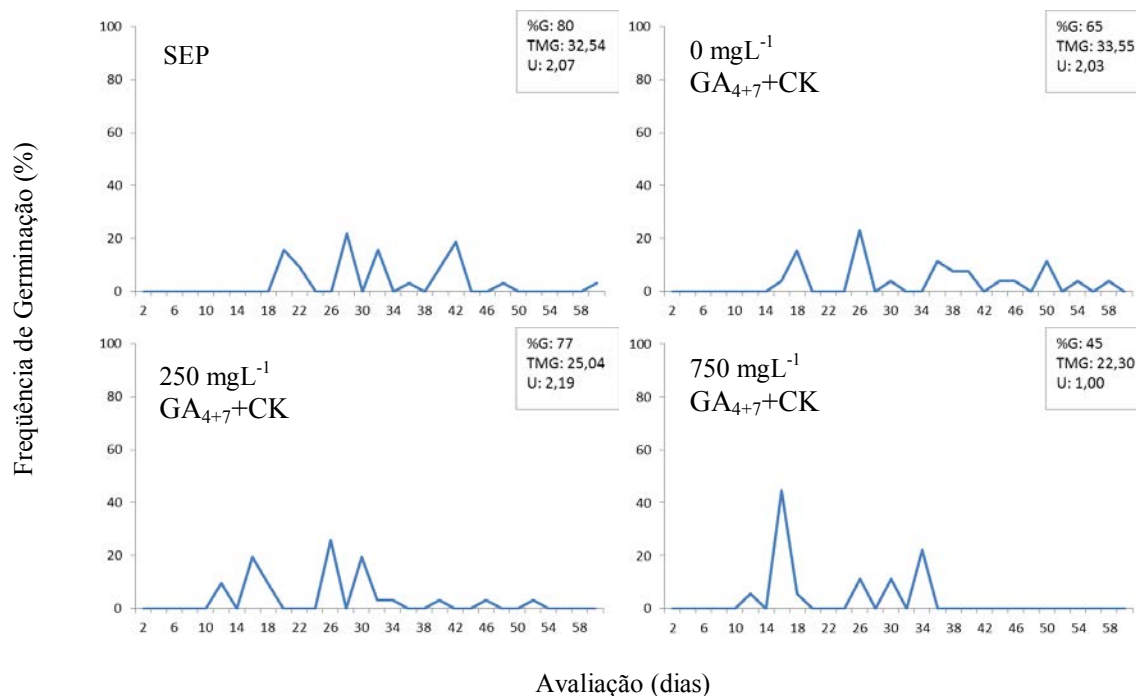
**Figura 6:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 91 DAF (dias após a floração) com 5% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



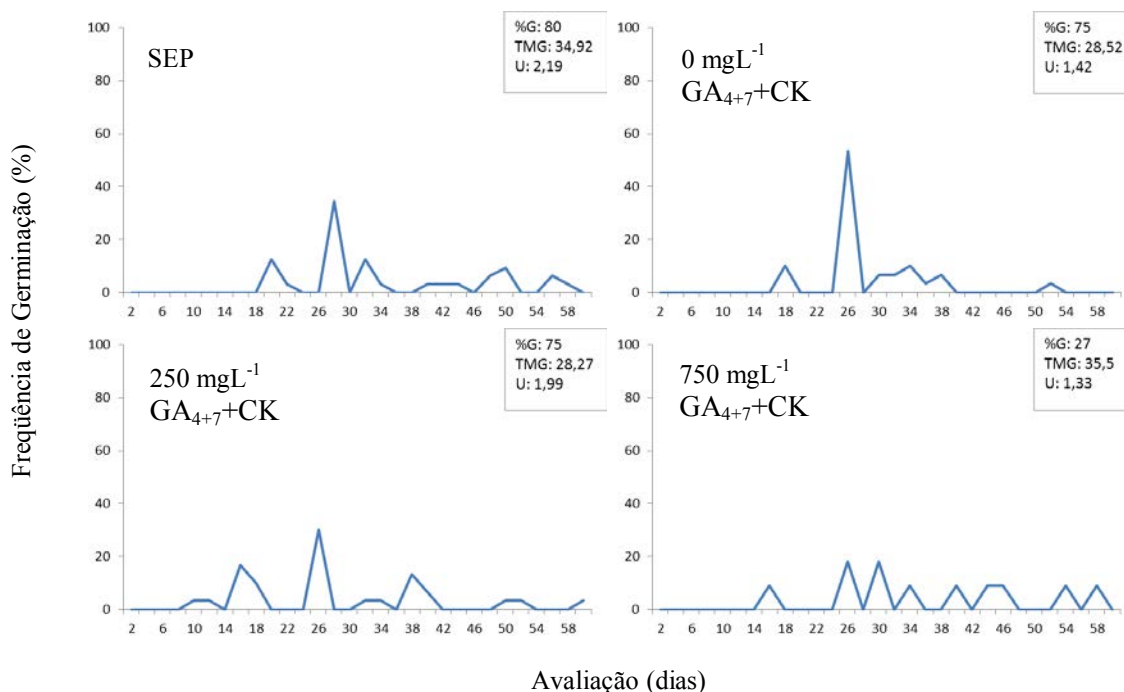
**Figura 7:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 116 DAF (dias após a floração) com 35% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



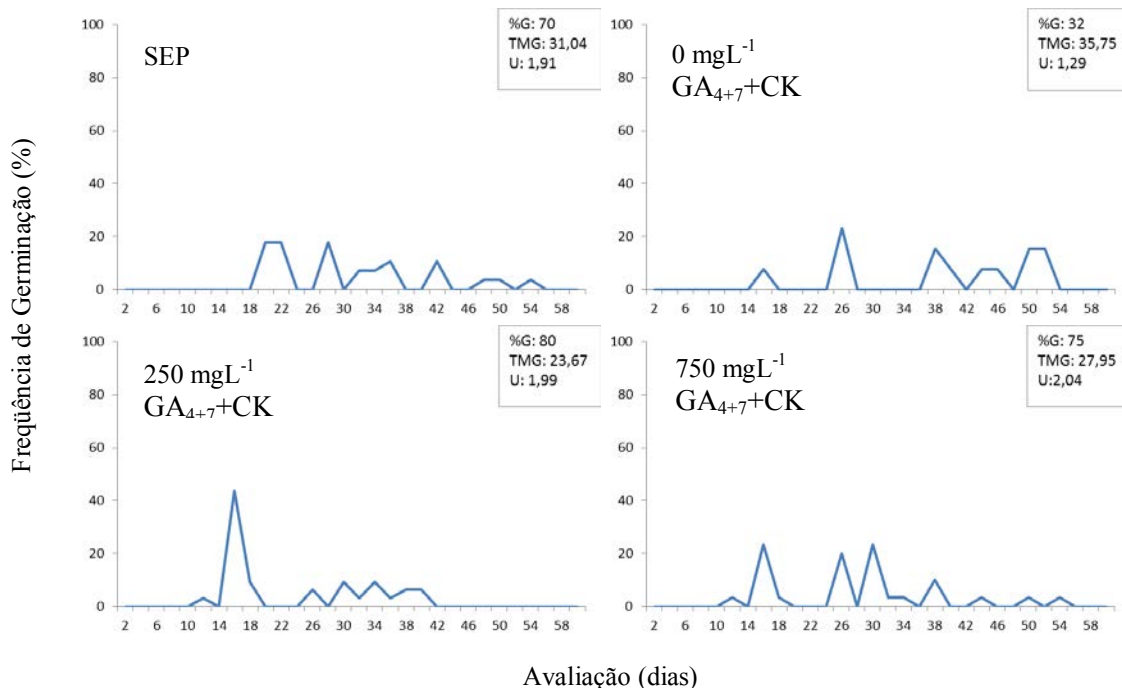
**Figura 8:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 116 DAF (dias após a floração) com 20% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



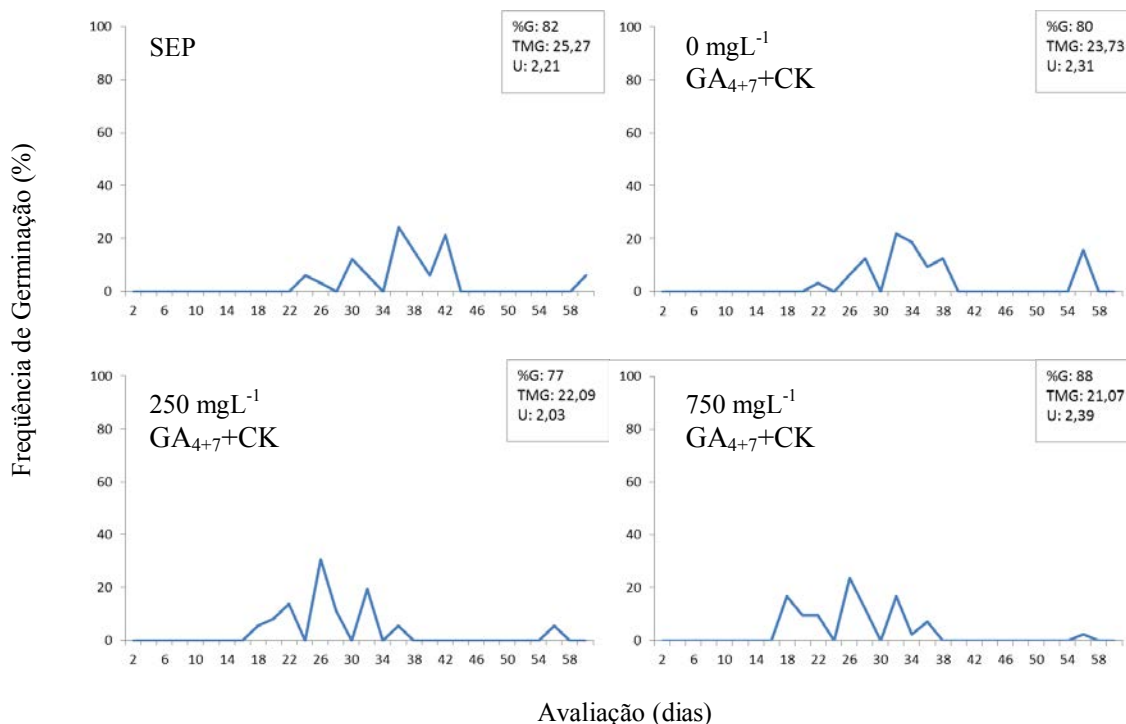
**Figura 9:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 116 DAF (dias após a floração) com 15% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



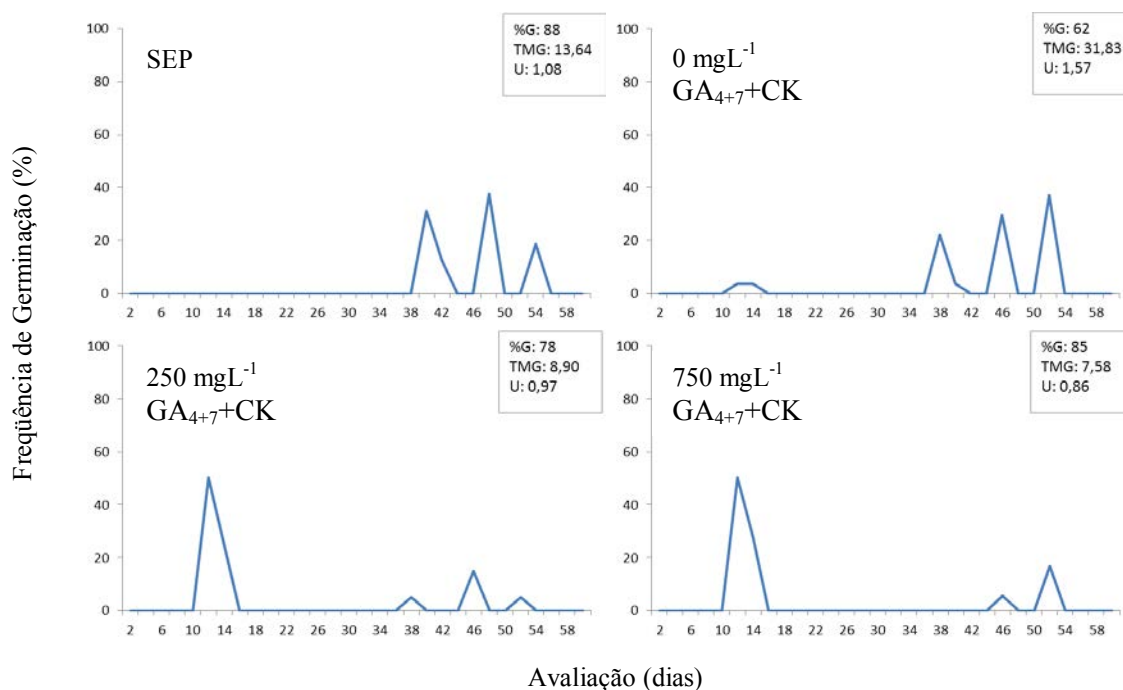
**Figura 10:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 116 DAF (dias após a floração) com 10% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



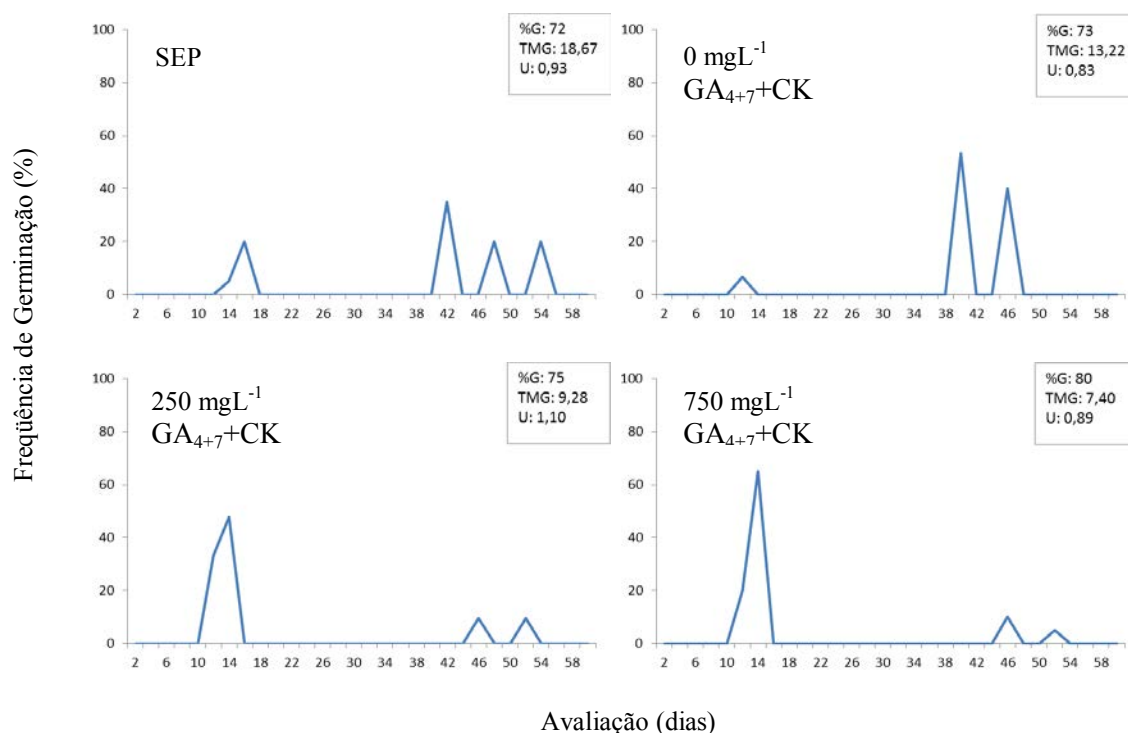
**Figura 11:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 116 DAF (dias após a floração) com 5% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



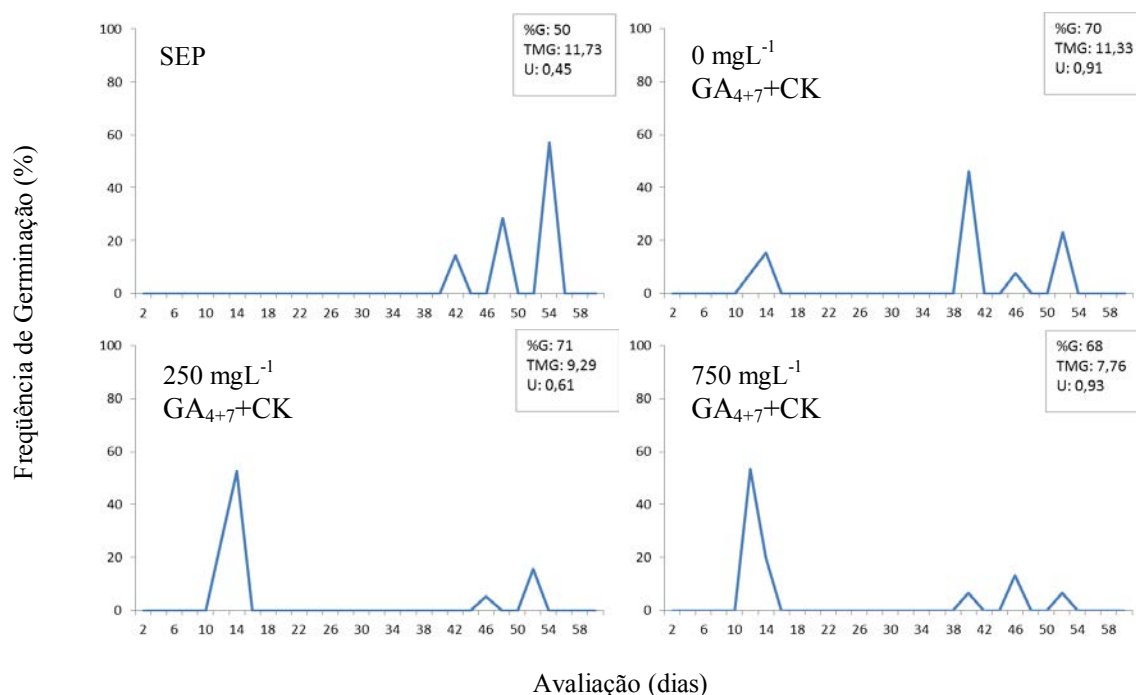
**Figura 12:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 133 DAF (dias após a floração) com 27% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



**Figura 13:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 133 DAF (dias após a floração) com 20% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.

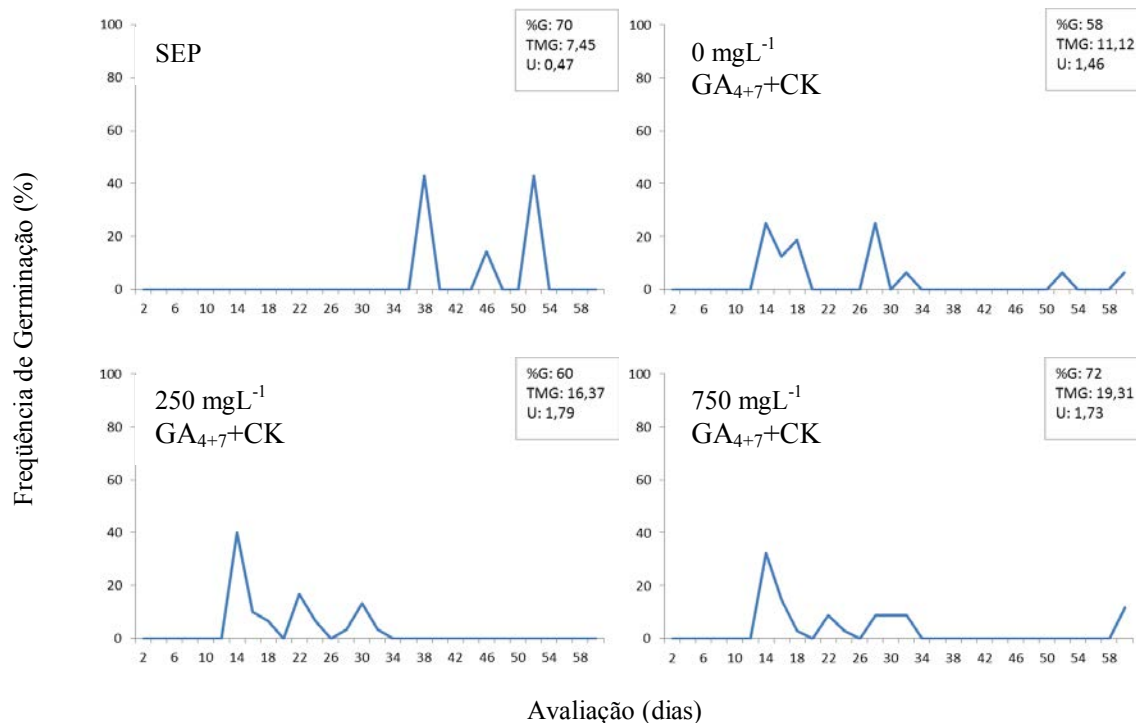


**Figura 14:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 133 DAF (dias após a floração) com 15% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.



**Figura 15:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 133 DAF (dias após a floração) com 10% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.





**Figura 16:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 133 DAF (dias após a floração) com 5% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.

**Tabela 5:** Atividade específica da enzima peroxidase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína), superóxido dismutase ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína) e teores de lipoperóxido ( $\text{nmol}\cdot\text{MDA}\cdot\text{g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer 91 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem e concentrações de  $\text{GA}_{4+7}$  + CK.

	SEP	0 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK	250 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK	750 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK
Peroxidase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína)				
59%	0,0033	0,0034	0,0018	0,0027
20%	0,0026	0,003	0,0025	0,0023
15%	0,0026	0,0038	0,0029	0,0029
10%	0,0028	0,0027	0,0017	0,0022
5%	0,0027	0,0019	0,0011	0,0015
Média	0,0028 AB	0,0030 A	0,0020 B	0,0023 AB
C.V (%)	26,46			
Atividade da Superóxido Dismutase ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína)				
59%	0,1439 aAB	0,1230 abB	0,0819 aB	0,2596 aA
20%	0,2087 aA	0,2033 abA	0,2164 aA	0,2268 aA
15%	0,1935 aA	0,1907 abA	0,2169 aA	0,2360 aA
10%	0,1371 aAB	0,2450 aA	0,0897 aB	0,1717 aAB
5%	0,1670 aA	0,0680 bA	0,0941 aA	0,1445 aA
C.V (%)	27,78			
Lipoperóxido ( $\text{nmol}\cdot\text{MDA}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)				
59%	9,362 aA	9,125 aA	9,680 aA	9,680 aA
20%	7,985 abA	5,887 bcAB	1,895 cC	5,522 abB
15%	4,780 cA	3,225 dA	2,735 cA	3,377 cA
10%	6,165 bcA	5,160 cdA	6,237 bA	7,027 bA
5%	8,355 abA	7,640 abA	7,167 aAB	5,195 abB
C.V (%)	18,74			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 6:** Atividade específica da enzima peroxidase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína), superóxido dismutase ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína) e teores de lipoperóxido ( $\text{nmol}\cdot\text{MDA}\cdot\text{g}^{-1}$  MS) sementes de *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer 116 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem e concentrações de  $\text{GA}_{4+7}$  + CK.

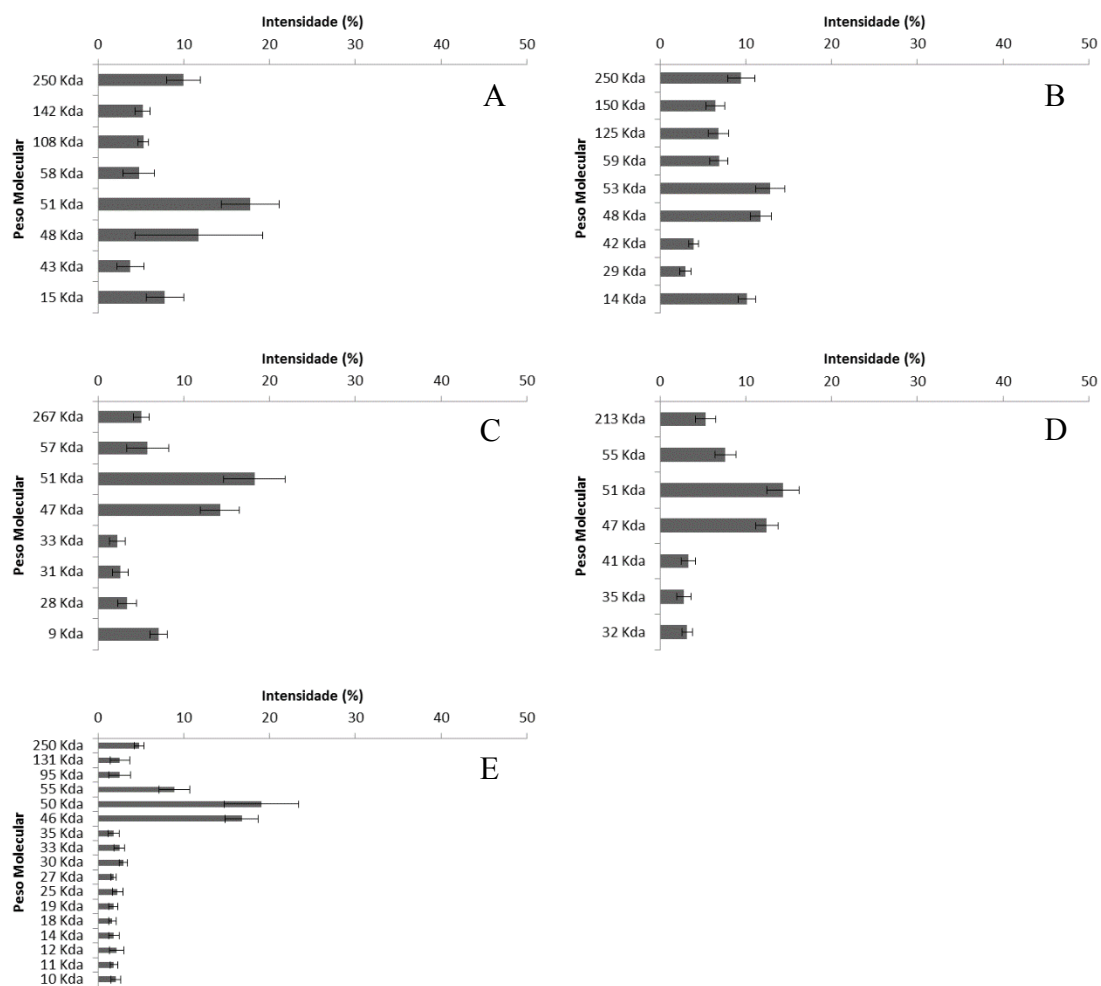
	SEP	0 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK	250 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK	750 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK
Peroxidase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína)				
35%	0,0026 aA	0,0031 aA	0,0029 aA	0,0029 abA
20%	0,0010 aA	0,0021 aA	0,0019 aA	0,0023 bA
15%	0,0016 aB	0,0024 aB	0,0029 aAB	0,0049 aA
10%	0,0021 aA	0,0018 aA	0,0020 aA	0,0025 bA
5%	0,0008 aA	0,0018 aA	0,0018 aA	0,0023 bA
Média	0,0016 B	0,0022 AB	0,0023 AB	0,0030 A
C.V (%)	31,05			
Atividade da Superóxido Dismutase ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína)				
35%	0,2037 aA	0,1693 aA	0,1373 aA	0,1487 aA
20%	0,1023 abA	0,0501 aA	0,1016 aA	0,1046 aA
15%	0,1286 abA	0,1189 aA	0,1809 aA	0,1541 aA
10%	0,0569 bA	0,0461 aA	0,1185 aA	0,1300 aA
5%	0,1667 abA	0,0637 aA	0,1026 aA	0,1585 aA
C.V (%)	33,79			
Lipoperóxido ( $\text{nmol}\cdot\text{MDA}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)				
35%	8,557 aA	7,677 abA	8,785 aA	8,940 aA
20%	8,497 aA	8,212 aA	7,412 aA	7,415 bA
15%	7,402 aA	6,650 bcAB	5,812 bB	5,950 cdB
10%	7,730 aA	6,035 cB	5,532 bB	6,507 bcAB
5%	5,567 bA	4,177 dB	4,842 bAB	5,010 dAB
Média	7,557 A	6,550 B	6,477 B	6,764 B
C.V (%)	10,10			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

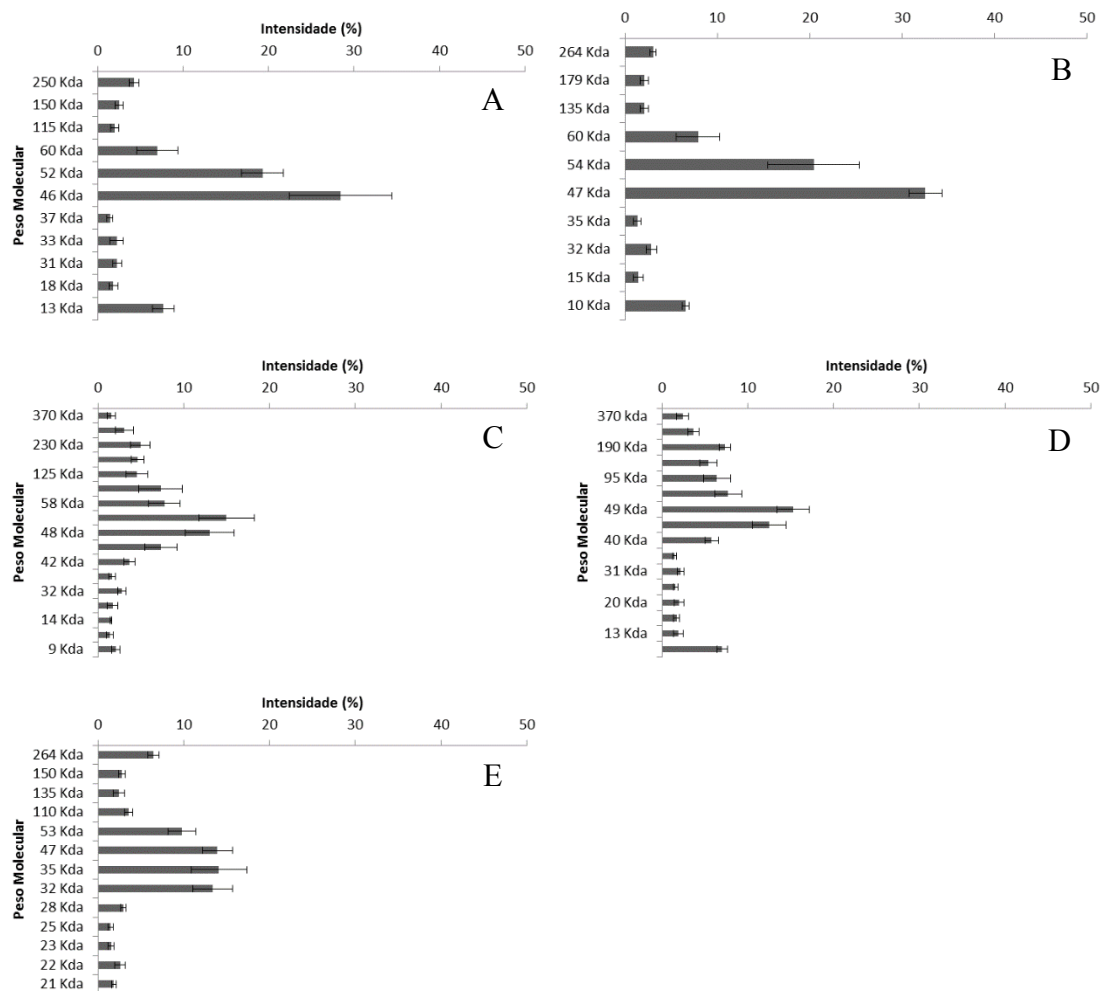
**Tabela 7:** Atividade específica da enzima peroxidase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min mg}^{-1}$  de proteína), superóxido dismutase ( $\text{U mg}^{-1}$  de proteína) e teores de lipoperóxido ( $\text{nmol MDA g}^{-1}$  MS) sementes de *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer 133 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem e concentrações de  $\text{GA}_{4+7}$  + CK.

	SEP	0 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK	250 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK	750 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK
Peroxidase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min mg}^{-1}$ de proteína)				
27%	0,0026	0,0034	0,0036	0,0021
20%	0,0018	0,0021	0,0019	0,0017
15%	0,0015	0,0023	0,0015	0,0013
10%	0,0016	0,0025	0,0031	0,0021
5%	0,0015	0,0013	0,0017	0,0021
C.V (%)	39,82			
Atividade da Superóxido Dismutase ( $\text{U mg}^{-1}$ proteína)				
27%	0,1674	0,1114	0,1679	0,1596
20%	0,1516	0,1125	0,1614	0,1015
15%	0,0785	0,0451	0,0602	0,1178
10%	0,0747	0,0581	0,0621	0,1018
5%	0,1146	0,0497	0,0552	0,0575
C.V (%)	41,68			
Lipoperóxido ( $\text{nmol MDA g}^{-1}$ MS)				
27%	13,610 aB	11,490 bB	16,570 aA	17,237 aA
20%	15,727 aA	15,362 aA	15,040 abA	14,392 bA
15%	15,482 aA	13,965 abA	12,940 bA	13,055 bA
10%	9,700 bA	3,727 cB	4,155 cB	3,727 cB
5%	2,262 cA	4,380 cA	2,310 cA	3,870 cA
C.V (%)	13,33			

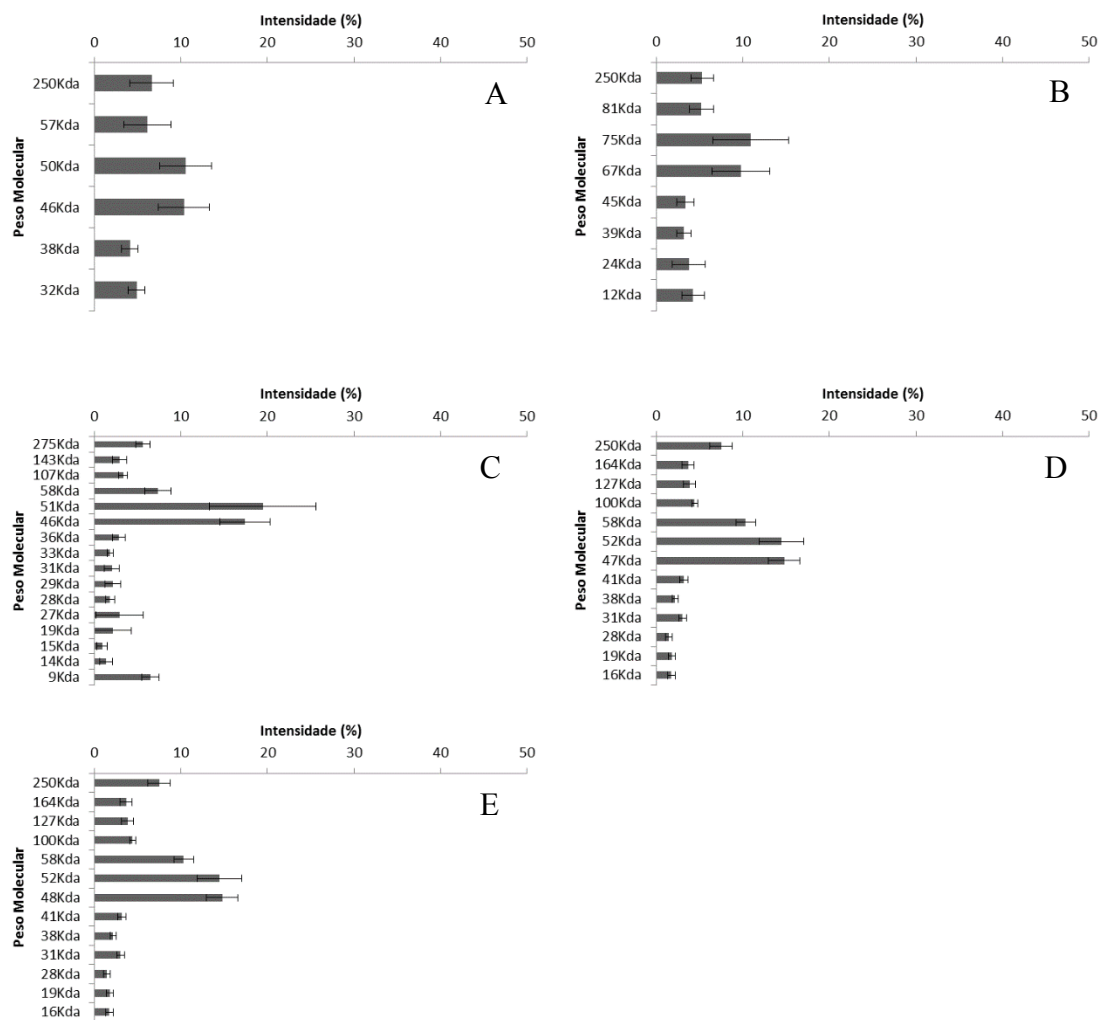
Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



**Figura 17:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, aos 91 DAF (dias após a floração). A: 59% água, B: 20% água, C: 15% de água, D: 10% de água e E: 5% de água. Barras de desvio padrão comparando os diferentes pesos moleculares.



**Figura 18:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, aos 116 DAF (dias após a floração). A: 35% água, B: 20% água, C: 15% de água, D: 10% de água e E: 5% de água. Barras de desvio padrão comparando os diferentes pesos moleculares.



**Figura 19:** Intensidade de bandas de proteínas LEA (%), após corrida eletroforética, das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer, aos 133 DAF (dias após a floração). A: 27% água, B: 20% água, C: 15% de água, D: 10% de água e E: 5% de água. Barras de desvio padrão comparando os diferentes pesos moleculares.

**Tabela 8:** Perfil de açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schltd.) H. Rainer 91 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem e concentrações de  $\text{GA}_{4+7}$  + CK.

SEP	$\text{GA}_{4+7}$ + CK			
	0 $\text{mgL}^{-1}$	250 $\text{mgL}^{-1}$	750 $\text{mgL}^{-1}$	
Ciclitóis ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
59%	5,78 aA	6,15 aA	6,10 aA	7,61 aA
20%	5,58 aA	3,73 ab AB	2,52 bB	3,25 bB
15%	4,07 abA	2,04 bc AB	0,10 bB	0,64 cB
10%	2,26 bA	1,53 bc A	1,59 bA	0,67 cA
5%	2,22 bA	0,30 cA	0,55 bA	0,10 cA
C.V (%)	28,29			
Glicose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
59%	4,36 aBC	2,70 aC	7,02 aA	5,98 aAB
20%	2,95 abA	2,92 aA	2,88 bA	2,69 bA
15%	1,88 bcA	1,71 aA	1,96 bA	3,09 bA
10%	0,79 cA	1,42 aA	1,63 bA	2,22 bA
5%	1,24 bcB	2,99 aA	2,43 bAB	1,87 bAB
C.V (%)	22,02			
Frutose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
59%	3,18 aA	2,20 aA	2,62 aA	3,07 aA
20%	2,65 aA	1,63 abA	1,46 abA	1,41 bA
15%	1,15 bAB	1,92 abA	0,53 bB	0,83 bAB
10%	0,85 bA	0,68 bA	0,68 bA	0,68 bA
5%	0,82 bA	0,90 abA	0,80 bA	0,65 bA
C.V (%)	32,62			
Sacarose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
59%	10,43 bC	28,28 aB	12,78 aC	53,97 aA
20%	41,10 aA	9,17 bB	6,24 abB	35,11 bA
15%	44,20 aA	3,50 bB	1,72 bB	5,27 cB
10%	15,80 bA	5,47 bB	3,90 abB	5,04 cB
5%	14,21 bA	4,28 bB	4,63 abB	6,74 cAB
C.V (%)	21,92			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



**Tabela 9:** Perfil de açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer 116 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem e concentrações de  $\text{GA}_{4+7}$  + CK.

	SEP	$0 \text{ mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	$250 \text{ mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	$750 \text{ mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$
Ciclitóis ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
35%	1,12 aA	0,78 aA	0,70 abA	0,08 aA
20%	1,13 aA	0,64 aA	0,86 abA	0,05 aA
15%	0,98 aA	0,69 aA	1,63 aA	1,34 aA
10%	0,71 aA	1,28 aA	0,98 abA	1,00 aA
5%	0,54 aA	0,79 aA	0,21 bA	0,69 aA
C.V (%)	54,59			
Glicose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
35%	2,47 aA	1,82 bA	2,38 aA	1,51 bA
20%	1,99 aA	1,67 bA	3,45 aA	2,23 bA
15%	1,22 aC	2,48 bBC	5,29 aB	13,06 aA
10%	2,65 aB	7,32 aA	3,19 aB	0,62 bB
5%	1,75 aA	2,36 bA	2,43 aA	0,45 bA
C.V (%)	36,45			
Frutose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
35%	0,89 aA	0,55 bA	0,62 aA	0,44 bA
20%	0,68 aA	0,49 bA	0,64 aA	0,77 bA
15%	0,65 aA	0,67 bB	1,53 aB	2,83 aA
10%	0,83 aB	1,85 aA	0,99 aAB	0,56 bB
5%	0,51 aA	0,76 bA	0,72 aA	0,44 bA
C.V (%)	38,07			
Sacarose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
35%	6,29 abcA	3,53 aA	2,82 bA	2,73 cA
20%	7,75 abA	4,76 aA	4,84 abA	5,66 bcA
15%	8,91 aA	2,29 aB	8,19 aA	8,53 abA
10%	2,99 bc B	0,97 aB	5,02 abB	10,99 aA
5%	2,32 cB	3,78 aAB	1,40 bB	6,97 abc A
C.V (%)	31,56			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 10:** Perfil de açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldt.) H. Rainer 133 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem e concentrações de  $\text{GA}_{4+7}$  + CK.

	SEP	0 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK	250 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK	750 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}$ +CK
Ciclitóis ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
27%	0,99 aA	0,47 aA	1,17 aA	1,18 abA
20%	0,94 aA	0,75 aA	0,61 aA	1,38 aA
15%	0,84 aA	0,72 aA	0,82 aA	1,07 abA
10%	1,08 aA	0,52 aA	0,97 aA	0,46 bA
5%	0,73 aA	0,64 aA	0,90 aA	0,98 abA
Média	0,92 AB	0,62 B	0,89 AB	1,02 A
C.V (%)	34,5			
Glicose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
27%	4,54 aAB	1,71 aB	4,32 aAB	6,19 aA
20%	1,52 abB	2,48 aAB	2,04 aB	5,70 aA
15%	1,09 abA	2,82 aA	1,37 aA	2,71 abA
10%	2,29 abA	2,16 aA	1,14 aA	1,65 bA
5%	0,46 bA	1,34 aA	1,87 aA	2,13 bA
C.V (%)	47,81			
Frutose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
27%	1,34 aAB	0,58 aB	1,22 aAB	1,61 aA
20%	0,67 aA	0,77 aA	0,57 aA	1,09 abA
15%	0,57 aA	0,93 aA	0,44 aA	1,00 abA
10%	0,74 aA	0,65 aA	0,43 aA	0,46 bA
5%	0,48 aA	0,47 aA	0,57 aA	0,61 abA
C.V (%)	44,4			
Sacarose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
27%	7,29 abA	3,48 abBC	5,10 aAB	0,28 bC
20%	9,55 aA	1,78 abB	0,92 bB	0,71 bB
15%	9,79 aA	2,24 abB	4,85 aB	5,09 aB
10%	5,91 bA	0,63 bB	4,72 aA	5,52 aA
5%	8,58 abA	4,50 aB	4,00 abB	5,87 aAB
C.V (%)	25,46			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

## Considerações

Com o estudo do desenvolvimento das sementes de *A. emarginata* pode-se elucidar questões de grande interesse que servirão como marco para estudos futuros assim como auxiliarão viveiristas na manutenção de suas sementes após colheita dos frutos:

- Sementes de *A. emarginata* não apresentam dormência morfológica nem fisiológica no momento da dispersão, alcançando porcentagens de germinação de aproximadamente 77%.

- Observamos que as sementes apresentam tolerância à dessecação, podendo ser consideradas ortodoxas. Após a extração das sementes é possível reduzir o conteúdo de água até 5% sem causar redução na porcentagem de germinação. No entanto, deve-se ter o cuidado de escolher o teor de água adequado (10%) assim como realizar a colheita dos frutos quando estes estiverem com aproximadamente 116 dias após a floração.

- As sementes apresentam em sua constituição vários mecanismos relacionados à tolerância à dessecação (açúcares solúveis, proteínas LEA) os quais devem auxiliar e permitir que as sementes sejam secas. Além disso, a redução artificial do teor de água não gerou um estresse oxidativo.

- Apesar das sementes tolerarem à dessecação não foi possível verificar a existência de sistemas efetivos para que as sementes pudessem ser mantidas em estado desidratado à -5°C por longos períodos (180 dias). A incapacidade de armazenamento dessas sementes por longos períodos, parece estar mais relacionada a danos causados pelo congelamento do que pela necessidade de sistemas de proteção, uma vez que tais sistemas como a presença de LEA e de açúcares solúveis (sacarose e rafinose), não foram suficientes para a manutenção da viabilidade das sementes por longos períodos.

- A aplicação dos reguladores teve uma função muito maior na sincronização e uniformização da germinação do que propriamente dito no aumento das germinação das sementes. No entanto, verificamos que com a sua aplicação, as sementes foram mais uniformes nas respostas à secagem. Essas observações levam à imaginar a existência da associação desses reguladores com o sistema de proteção de membranas, o que deve ser melhor explorado.

- Tendo em vista a aplicação prática desse trabalho, podemos então estabelecer que as sementes de *A. emarginata* podem ser coletadas por viveiristas à partir dos 116 DAF (final do mês de janeiro), quando ao balançar as árvores frutos com a casca de

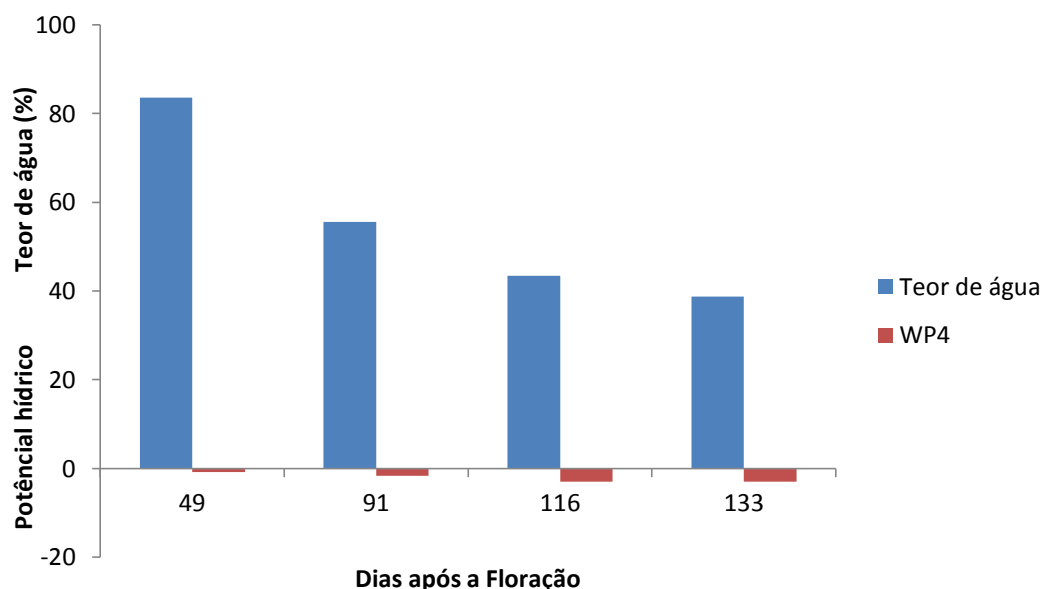
coloração amarelada se desprendem da planta mãe. Neste momento, as sementes podem ter o conteúdo de água reduzido artificialmente, já que apresentam tolerância à dessecação a qual é mantida quando os frutos são dispersos aos 133 DAF (meados do mês de fevereiro). No entanto, não aconselhamos o armazenamento dessas sementes à temperaturas negativas, visto que a viabilidade é perdida.

## Apêndices<sup>9</sup>

---

<sup>9</sup> Resultados referentes à Maturação e Aquisição da Tolerância à Dessecação das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) Hainer: Ciclo 2011/2012.

**Experimento 1: Maturação e tolerância à dessecação das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) Hainer. Ciclo 2011/2012.**



**Figura 1:** Teor de água e potencial hídrico das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer ao longo do estudo da maturação dos frutos [49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração)].

**Tabela 1:** Massa (g), diâmetro (mm), comprimento (mm), pH, sólidos solúveis totais (°Brix) dos frutos e massa seca das sementes (mg) de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer 49, 91, 116 e 133 DAF (dias após a floração).

Dias Após Floração (DAF)	Massa (mg)	Diâmetro (mm)	Comprimento (mm)	pH	Sólidos Solúveis (°Brix)	Massa seca Sementes (mg)
49 dias	237,95	33,75	30,97	5,40	4,71	0,37
91 dias	340,47	41,76	34,04	5,80	8,00	0,76
116 dias	467,02	46,37	35,62	4,42	11,05	1,50
133 dias	327,48	32,94	36,97	4,43	9,79	1,32
C.V (%)	14,05	5,49	7,11	5,72	26,57	5,30

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 2:** Conteúdo de proteína total (mg/g massa seca), atividade da enzima peroxidase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína), superóxido dismutase [SOD ( $\text{U mg}^{-1}$ )], teores de lipoperóxido [MDA ( $\text{nmol g}^{-1}$ )] das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldt. H. Rainer) aos 49 DAF (dias após a floração) submetidas à diferentes níveis de secagem e embebição em diferentes concentrações de  $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$ .

	SEP	0 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	250 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	750 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$
<b>Proteína Solúvel Total (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
86%	2,660	0,247	4,518	0,617
20%	1,999	0,619	0,402	0,069
15%	2,175	0,018	0,364	0,467
10%	1,770	0,411	0,443	0,157
5%	1,175	0,562	0,042	0,625
C.V (%)				
<b>POD (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min mg}^{-1}</math>)</b>				
86%	0,763	8,709	0,414	4,134
20%	0,447	0,651	2,718	6,594
15%	0,320	6,650	0,279	0,307
10%	0,484	0,357	0,455	3,664
5%	0,742	3,087	5,360	0,360
C.V (%)				
<b>SOD (<math>\text{U mg}^{-1}</math>)</b>				
86%	47,191	368,142	27,378	173,704
20%	14,697	64,116	275,785	621,365
15%	11,925	1647,907	70,956	57,117
10%	14,449	65,276	76,626	662,699
5%	492,953	492,953	497,535	34,547
C.V (%)				
<b>MDA (<math>\text{nmol g}^{-1}</math>)</b>				
86%	34,618	24,784	18,883	24,980
20%	16,265	5,081	5,806	4,315
15%	13,624	5,806	5,769	6,528
10%	11,541	4,875	4,731	4,588
5%	4,349	4,992	4,550	4,380
C.V (%)				

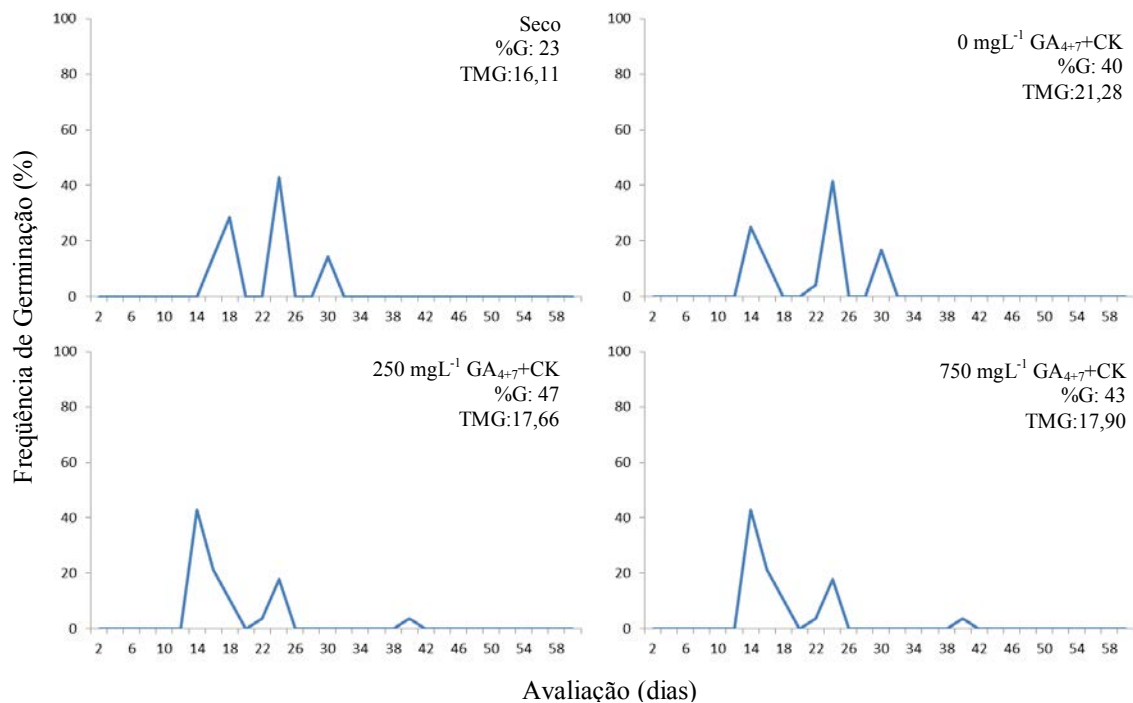
Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 3:** Germinação [G (%)], tempo médio de germinação [TMG (dias)], índice de velocidade de germinação [IVG] das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schltd. H. Rainer) com 91 DAF (dias após a floração) submetidas a níveis de secagem e concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.

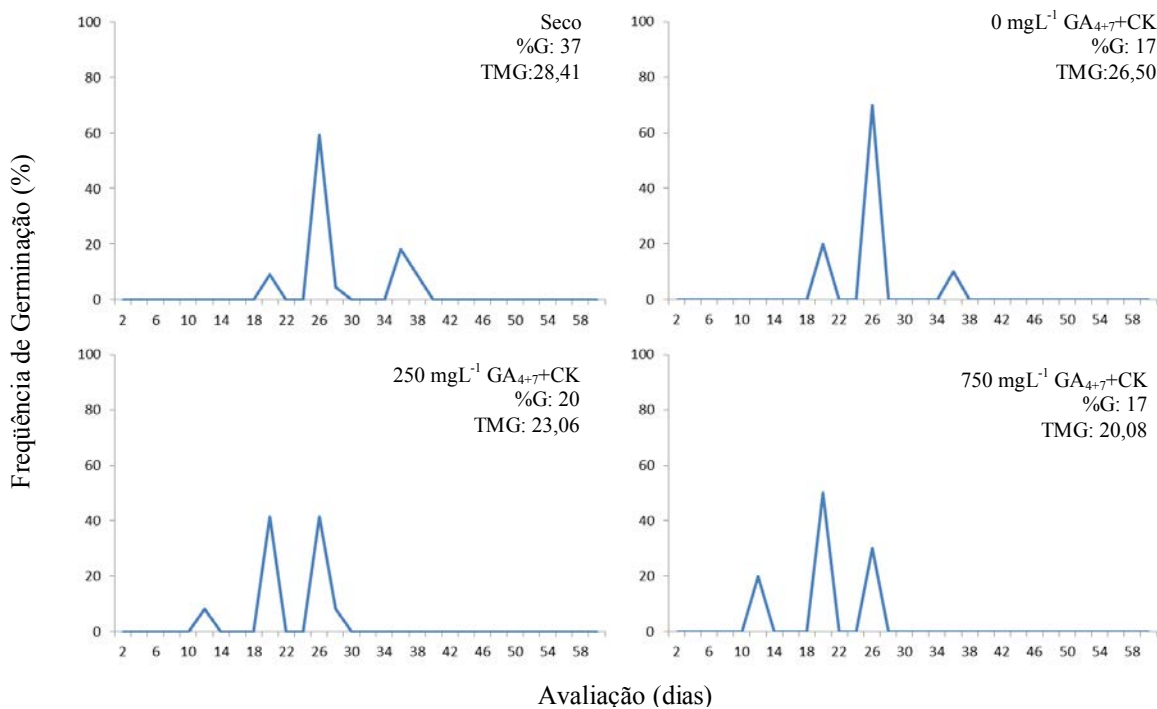
	SEP	0 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	250 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	750 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK
Germinação (%)				
56%	23 aB	40 aAB	47 aA	43 aAB
20%	37 aA	17 bA	20 bA	17 bA
15%	28 aA	23 abA	18 bA	27 abA
10%	28 aA	18 abA	12 bA	20 bA
5%	22 aA	8 bA	22 bA	13 bA
C.V (%)	46,16			
Tempo médio de Germinação (dias)				
56%	16,11 bA	21,28 aA	17,66 aA	17,90 abA
20%	28,41 aA	26,50 aA	23,06 aA	20,08 abA
15%	23,75 abA	23,25 aA	17,70 aA	26,31 aA
10%	19,80 abA	20,46 aA	19,00 aA	18,20 abA
5%	18,60 abA	21,25 aA	18,50 aA	13,08 bA
C.V (%)	27,83			
IVG				
56%	12,91 aB	25,80 aAb	47,51 aA	46,54 aA
20%	13,46 aA	9,55 aA	6,08 bA	8,61 bA
15%	10,26 aA	9,98 aA	14,93 bA	25,28 abA
10%	34,62 aA	23,26 aA	19,09 bA	15,51 bA
5%	27,93 aAB	7,86 aAB	32,10 abA	6,90 bB
C.V (%)	66,51			

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

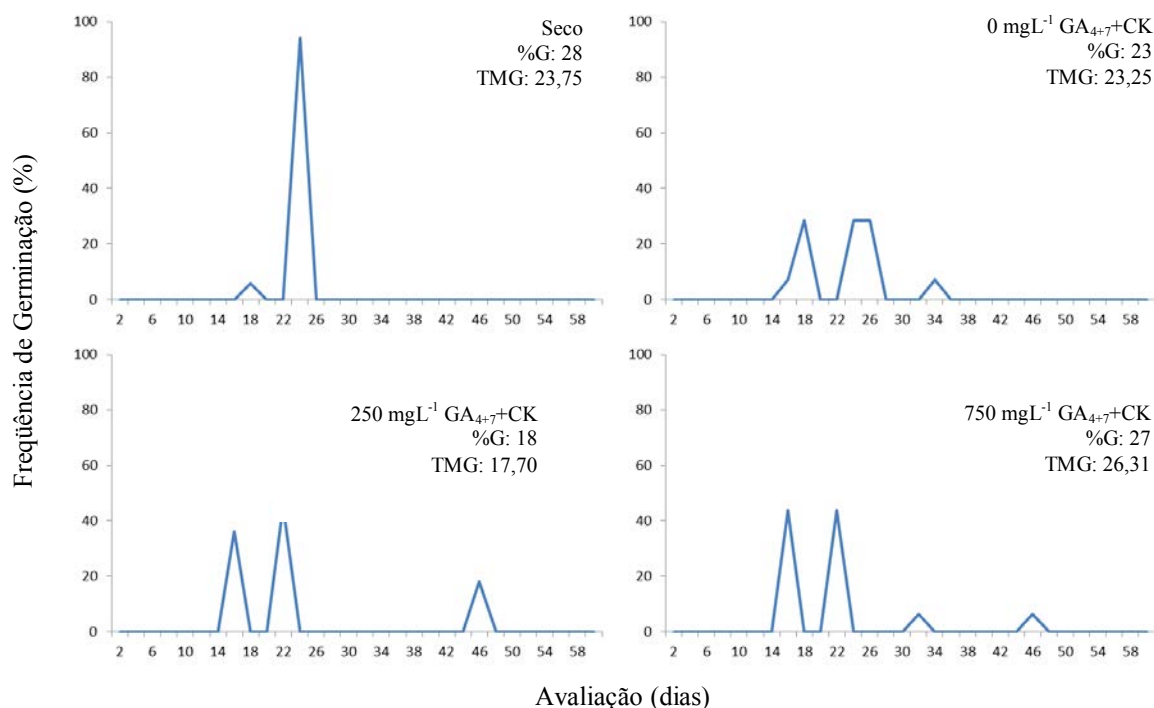




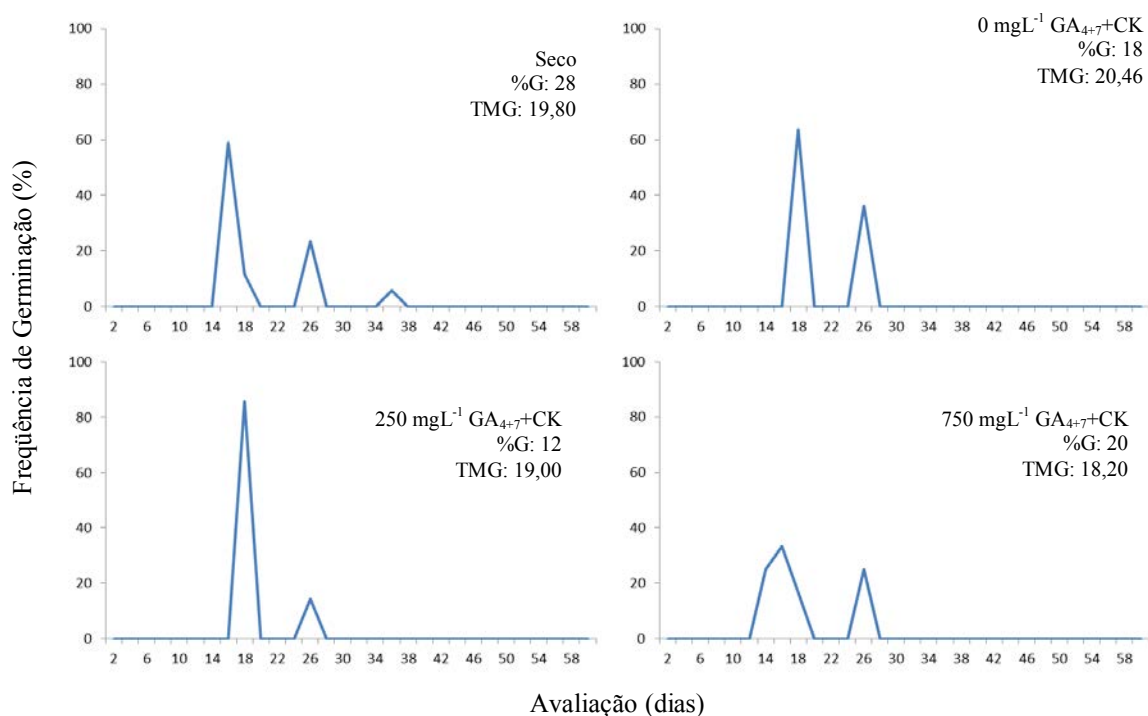
**Figura 2:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 91 DAF com 56% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.



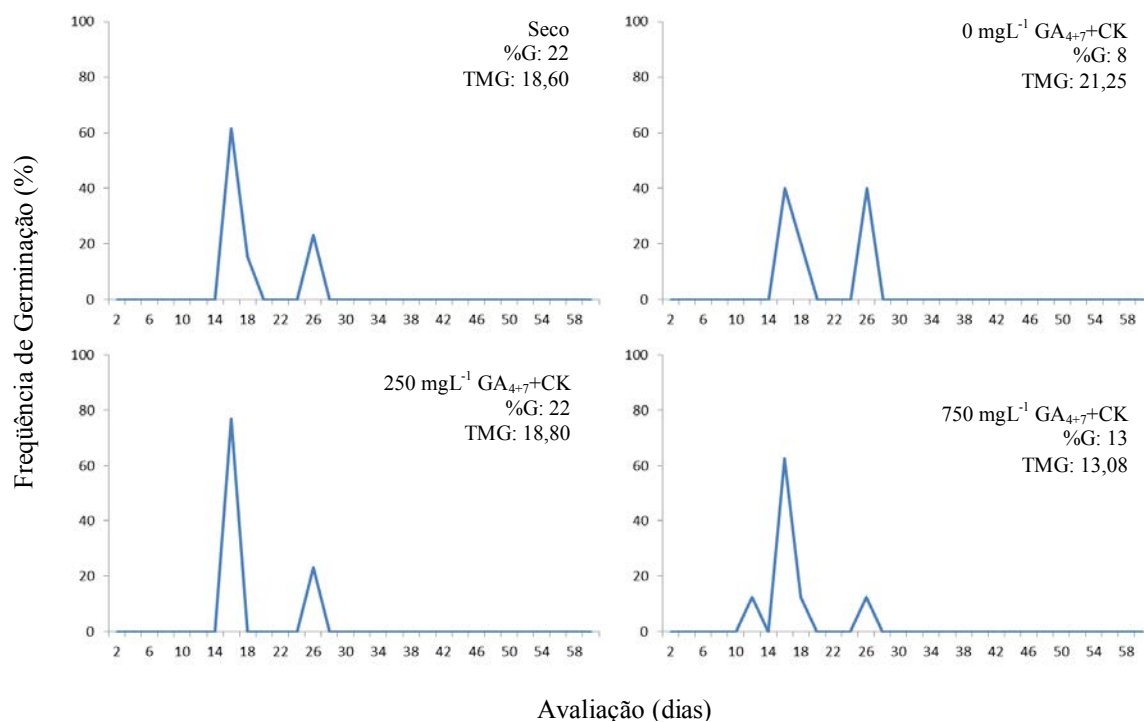
**Figura 3:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 91 DAF com 20% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.



**Figura 4:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 91 DAF com 15% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.



**Figura 5:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 91 DAF com 10% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.



**Figura 6:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 91 DAF com 5% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.

**Tabela 4:** Conteúdo de proteína total (mg/g massa seca), atividade da enzima peroxidase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína), superóxido dismutase [SOD ( $\text{U mg}^{-1}$ )], teores de lipoperóxido [MDA ( $\text{nmol g}^{-1}$ )] das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldt. H. Rainer) aos 91 DAF submetidas à diferentes níveis de secagem e embebição em diferentes concentrações de  $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$ .

	SEP	0 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	250 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	750 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$
	Proteína Solúvel Total ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)			
56%	5,431	4,301	4,327	3,496
20%	1,948	1,995	2,813	2,331
15%	2,310	2,035	2,085	2,052
10%	2,198	1,820	2,067	2,010
5%	2,111	1,924	1,877	1,959
C.V (%)				
	POD ( $\text{umol.min mg}^{-1}$ )			
56%	0,615	0,423	0,496	0,444
20%	1,401	0,409	0,378	0,402
15%	0,373	0,559	0,421	0,385
10%	0,413	0,316	0,426	0,405
5%	0,508	0,383	0,398	0,353
C.V (%)				
	SOD ( $\text{U mg}^{-1}$ )			
56%	6,938	11,960	9,903	12,816
20%	20,418	10,780	10,433	11,134
15%	7,572	12,610	11,089	10,451
10%	6,468	13,164	10,422	12,811
5%	10,865	12,259	11,944	11,182
C.V (%)				
	MDA ( $\text{nmol g}^{-1}$ )			
56%	19,339	16,213	15,849	19,121
20%	10,789	9,798	8,911	7,984
15%	7,742	10,816	7,704	7,457
10%	6,846	5,484	7,061	6,667
5%	8,489	8,081	4,211	4,890
C.V (%)				

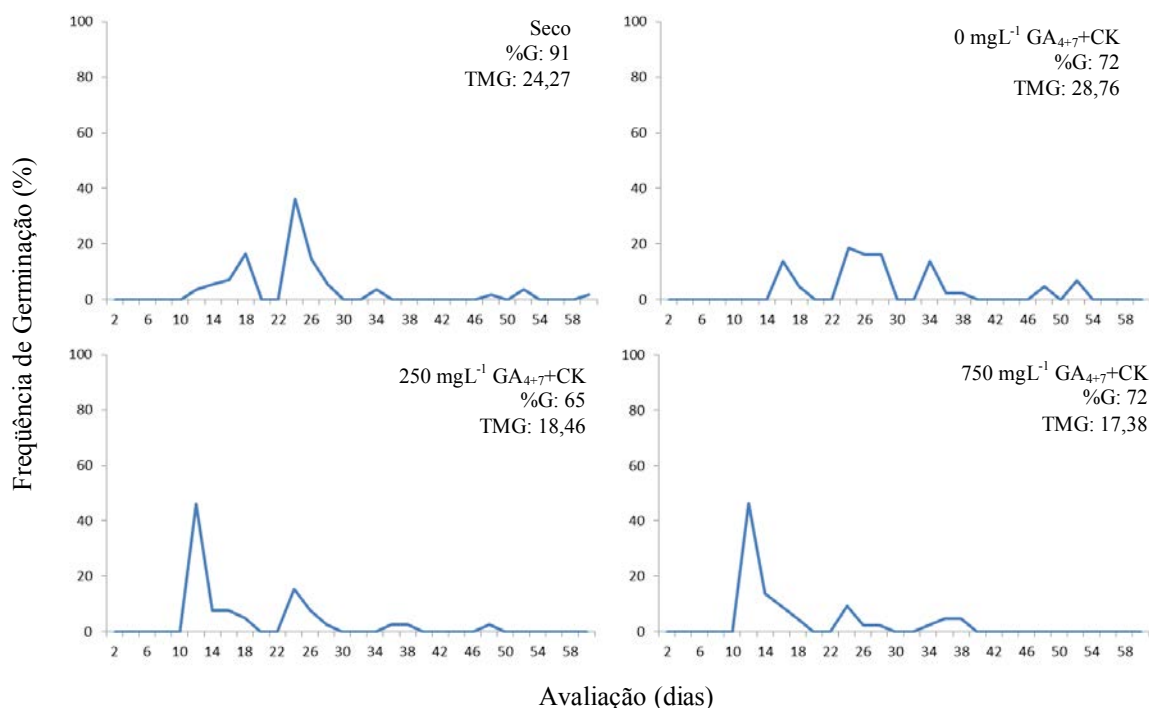
**Tabela 5:** Conteúdo de açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 49, 91, 116 e 133 DAF submetidas à diferentes níveis de secagem e embebição em diferentes concentrações de  $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$ .

	Glicose	Frutose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)	Sacarose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)	Rafinose ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)
49 DAF				
56%	0,311	0,123	1,174	0,181
20%	0,019	0,059	0,265	0,079
15%	0,053	0,046	0,396	0,149
10%	0,146	0,068	0,684	0,198
5%	0,010	0,029	0,004	0,186
C.V (%)				
91 DAF				
56%	1,352	0,935	8,260	0,227
20%	0,657	0,578	6,752	0,045
15%	0,431	0,415	4,458	0,000
10%	0,202	0,253	0,939	0,218
5%	1,261	1,044	4,722	0,104
C.V (%)				
116 DAF				
56%	1,053	1,247	3,536	0,000
20%	0,546	0,534	2,375	0,000
15%	0,326	0,340	1,966	0,035
10%	0,121	0,139	2,648	0,103
5%	0,980	0,859	1,620	0,036
C.V (%)				
133 DAF				
56%	0,659	0,506	2,792	0,195
20%	0,242	0,154	0,474	0,128
15%	1,169	1,548	0,036	0,051
10%	0,453	0,526	0,612	0,239
5%	0,204	0,243	1,162	0,175
C.V (%)				

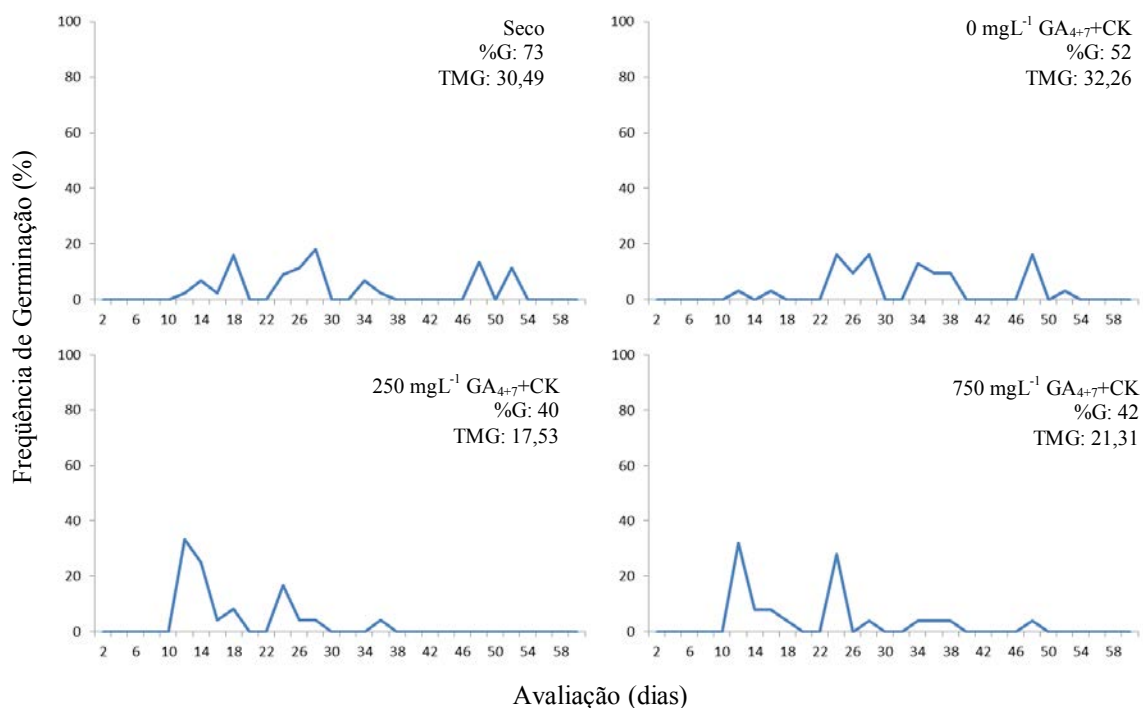
**Tabela 6:** Germinação [G (%)], tempo médio de germinação [TMG (dias)], índice de velocidade de germinação [IVG] das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldt. H. Rainer) com 116 DAF submetidas a níveis de secagem e concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.

	SEP	0 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	250 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	750 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK
Germinação (%)				
43%	91 aA	72 aA	65 aA	72 aA
20%	73 abA	52 abAB	40 aB	42 bB
15%	62 bA	38 bA	45 aA	50 abA
10%	83 abA	72 aAB	53 aB	53 abB
5%	58 bA	35 bA	50 aA	55 abA
C.V (%)	25,61			
Tempo médio de Germinação (dias)				
43%	24,27 aAB	28,76 abA	18,46 aB	17,38 aB
20%	30,49 aA	32,26 abA	17,53 aB	21,31 aB
15%	28,51 aA	33,66 aA	15,76 aB	16,66 aB
10%	28,68 aA	28,56 abA	18,87 aB	18,25 aB
5%	23,98 aA	24,81 bA	19,62 aA	20,51 aA
C.V (%)	16,65			
IVG				
43%	12,52 aB	15,46 aB	34,51 aA	39,52 aA
20%	7,94 aA	4,40 aA	18,26 aA	16,59 bA
15%	10,77 aBC	4,44 aC	27,27 aAB	30,42 abA
10%	7,57 aB	13,19 aAB	28,19 aA	22,36 abAB
5%	7,70 aA	5,00 aA	17,75 aA	12,29 bA
C.V (%)	54,21			

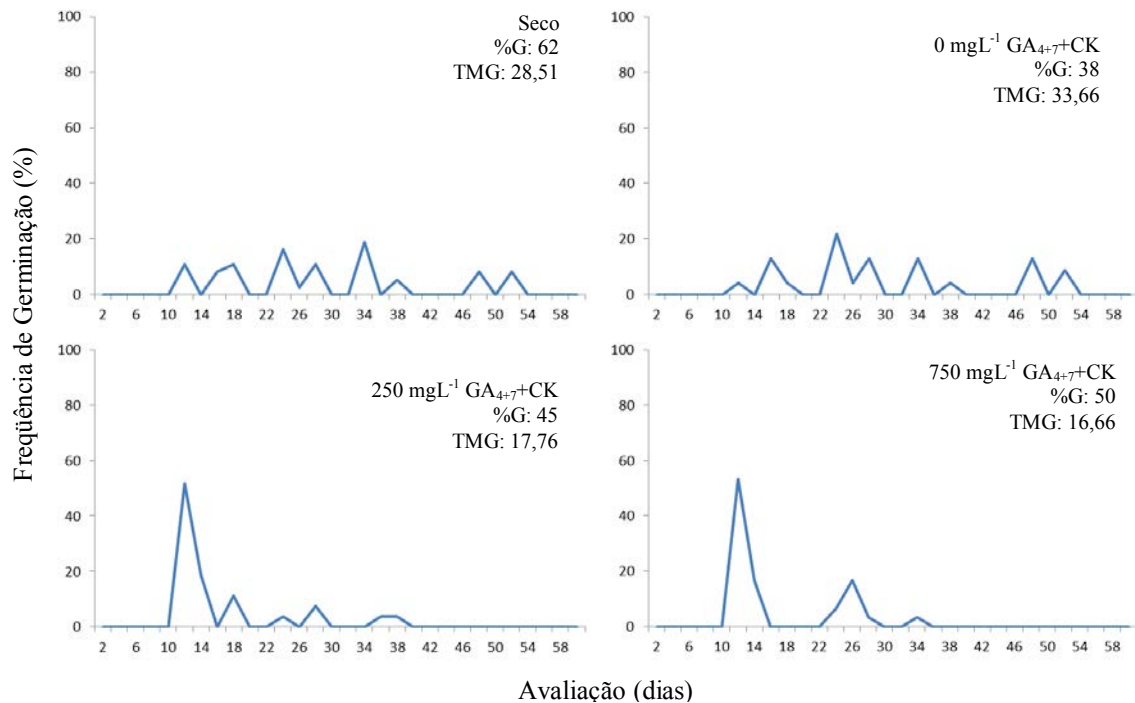
Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



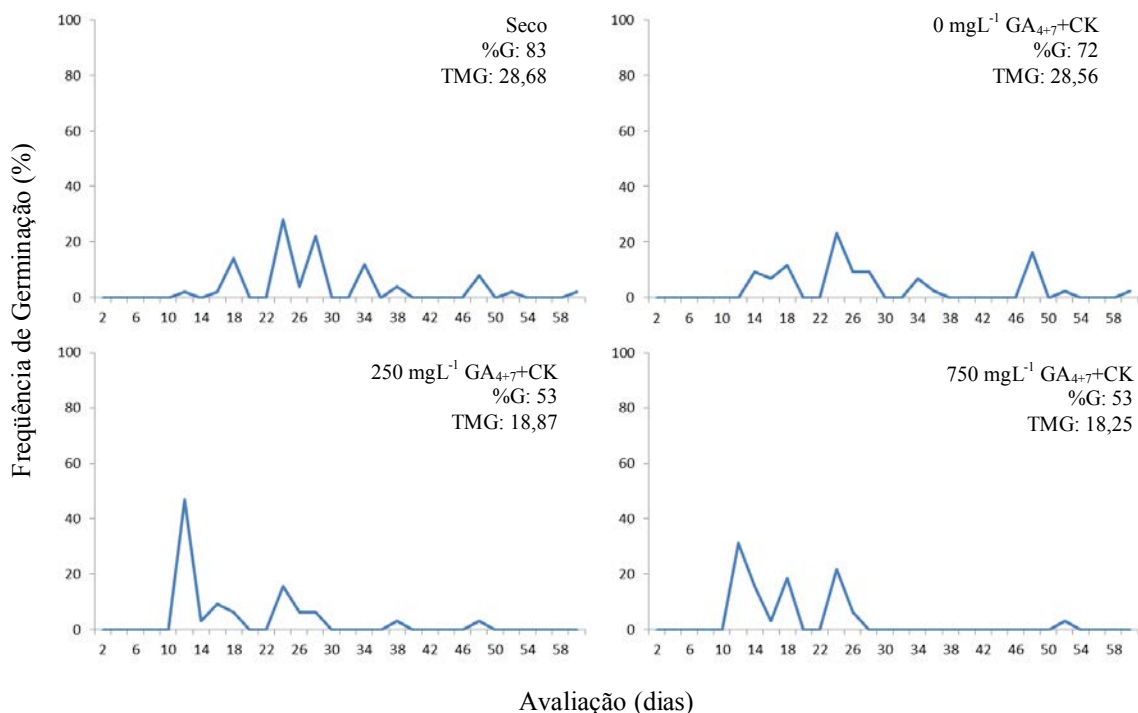
**Figura 7:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 116 DAF com 43% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.



**Figura 8:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 116 DAF com 20% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.

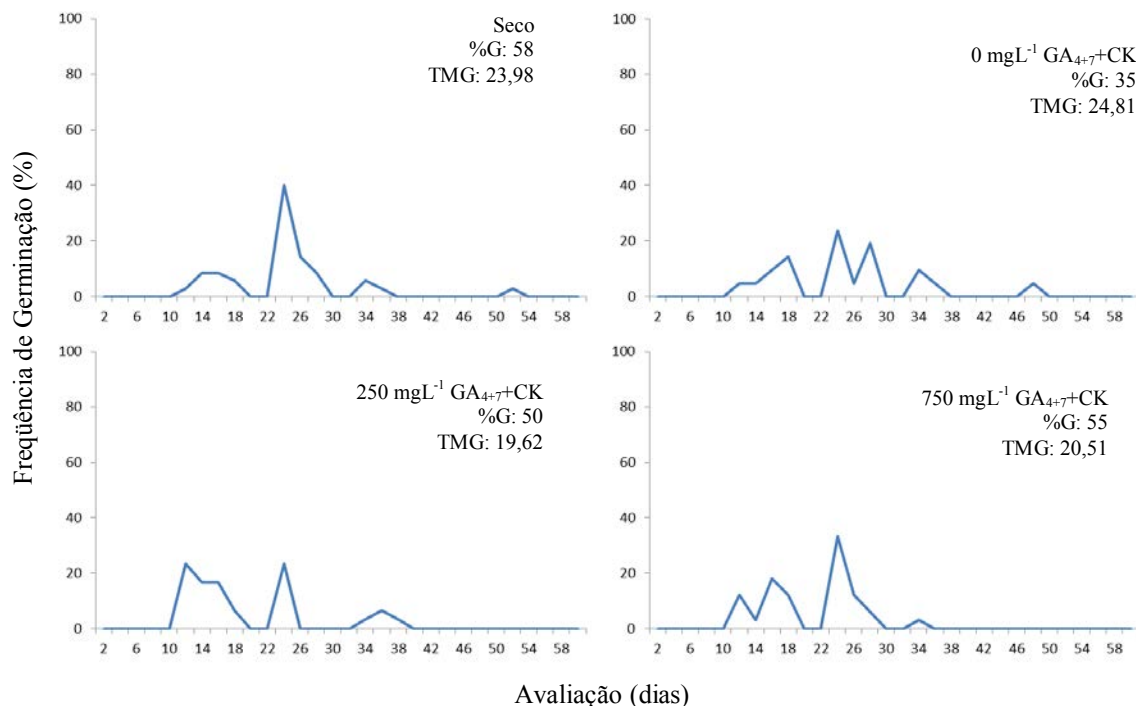


**Figura 9:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 116 DAF com 15% de água embebidas em diferentes concentrações de  $GA_{4+7}+CK$ . Ciclo 2011/2012.



**Figura 10:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 116 DAF com 10% de água embebidas em diferentes concentrações de  $GA_{4+7}+CK$ . Ciclo 2011/2012.





**Figura 11:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 116 DAF com 5% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.

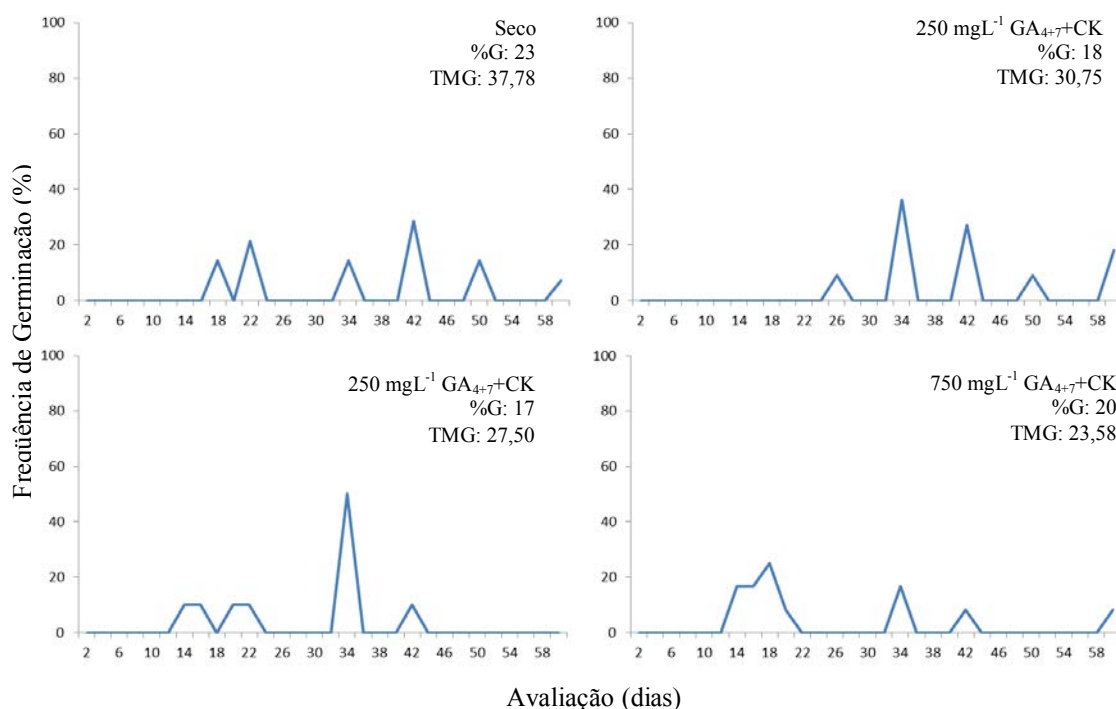
**Tabela 7:** Conteúdo de proteína total (mg/g massa seca), atividade da enzima peroxidase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína), superóxido dismutase [SOD ( $\text{U mg}^{-1}$ )], teores de lipoperóxido [MDA ( $\text{nmol g}^{-1}$ )] das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldt. H. Rainer) aos 116 DAF submetidas à diferentes níveis de secagem e embebição em diferentes concentrações de  $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$ .

	SEP	$0 \text{ mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	$250 \text{ mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	$750 \text{ mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$
<b>Proteína Solúvel Total (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
43%	3,579	3,388	3,382	3,481
20%	2,641	2,128	2,314	2,101
15%	2,499	2,100	2,019	2,086
10%	2,185	2,181	2,013	1,919
5%	2,044	1,821	2,046	1,968
C.V (%)				
<b>POD (<math>\mu\text{mol}.\text{min mg}^{-1}</math>)</b>				
43%	0,767	0,378	0,317	0,407
20%	0,541	0,293	0,168	0,248
15%	0,332	0,265	0,242	0,336
10%	0,572	0,389	0,376	0,343
5%	0,441	0,359	0,285	0,293
C.V (%)				
<b>SOD (<math>\text{U mg}^{-1}</math>)</b>				
43%	63,853	58,469	52,126	50,030
20%	54,758	75,567	51,586	63,600
15%	52,907	61,863	55,477	50,872
10%	55,151	50,884	24,689	20,465
5%	30,941	14,088	26,508	12,987
C.V (%)				
<b>MDA (<math>\text{nmol g}^{-1}</math>)</b>				
43%	12,982	8,309	6,363	6,259
20%	4,194	7,615	7,628	6,613
15%	8,273	6,034	6,869	7,590
10%	9,701	3,728	4,158	3,728
5%	2,535	4,380	2,309	3,871
C.V (%)				

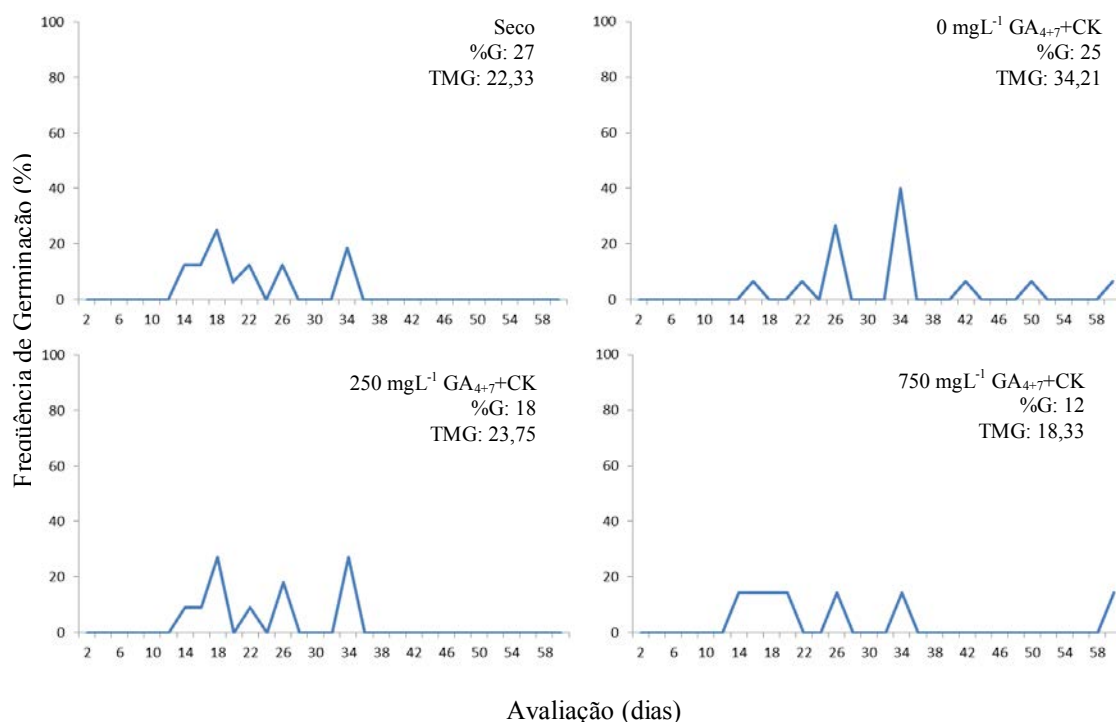
**Tabela 8:** Germinação [G (%)], tempo médio de germinação [TMG (dias)], índice de velocidade de germinação [IVG] das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldt. H. Rainer) com 133 DAF submetidas a níveis de secagem e concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK.

	SEP	0 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	250 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK	750 mgL <sup>-1</sup> GA <sub>4+7</sub> +CK
Germinação (%)				
39%	23 aA	18 abA	17 aA	20 aA
20%	27 aA	25 aA	18 aA	12 abA
15%	27 aA	18 abA	17 aA	13 abA
10%	17 abA	10 abA	18 aA	10 abA
5%	5 bA	7 bA	2 aA	0 bA
C.V (%)	55,6			
Tempo médio de Germinação (dias)				
39%	37,78 aA	30,75 aA	27,50 abA	23,58 aA
20%	22,33 abA	34,21 aA	23,75 abA	18,33 abA
15%	28,73abA	28,62 aA	25,70 abA	28,75 aA
10%	33,66 abA	16,75 aA	30,08 aA	13,75 abA
5%	13,50 bA	20,00 aA	4,50 bA	0 bA
C.V (%)	50,83			
IVG				
39%	14,80 aA	8,59 aA	9,30 aA	17,80 aA
20%	20,64 aA	5,60 aA	11,70 aA	9,11 aA
15%	14,14 aA	10,13 aA	14,73 aA	6,48 aA
10%	11,07 aA	13,25 aA	18,92 aA	15,23 aA
5%	5,66 aA	7,38 aA	5,00 aA	0 aA
C.V (%)	101,75			

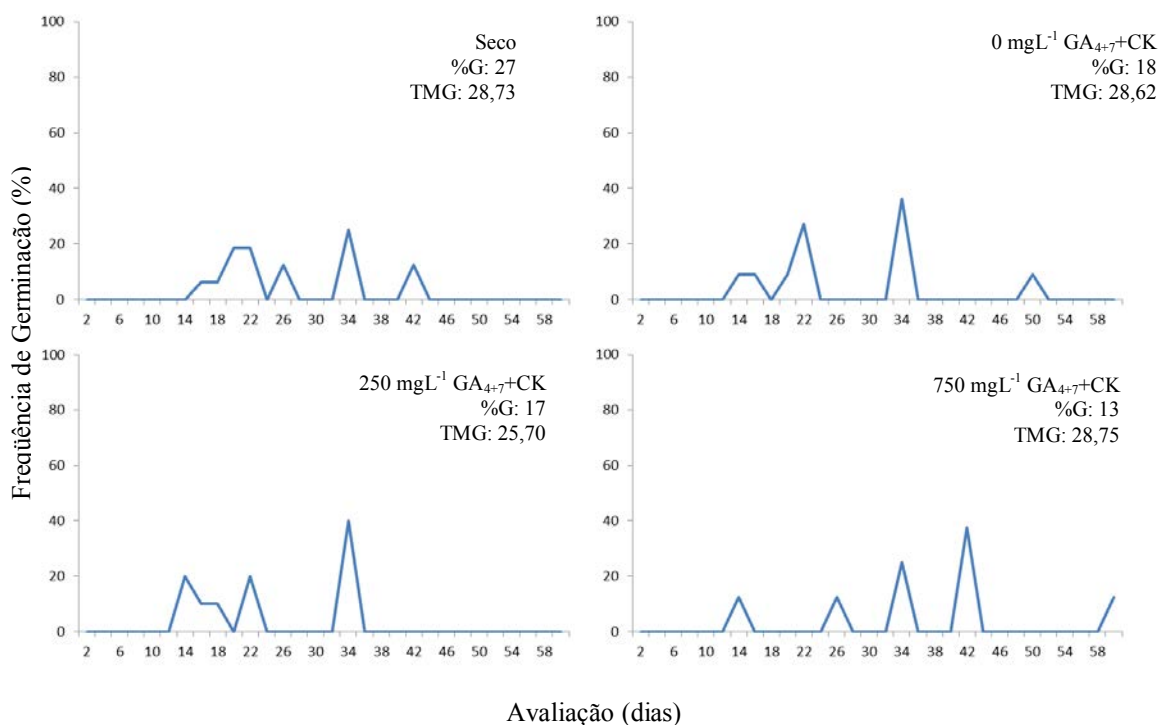
Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.



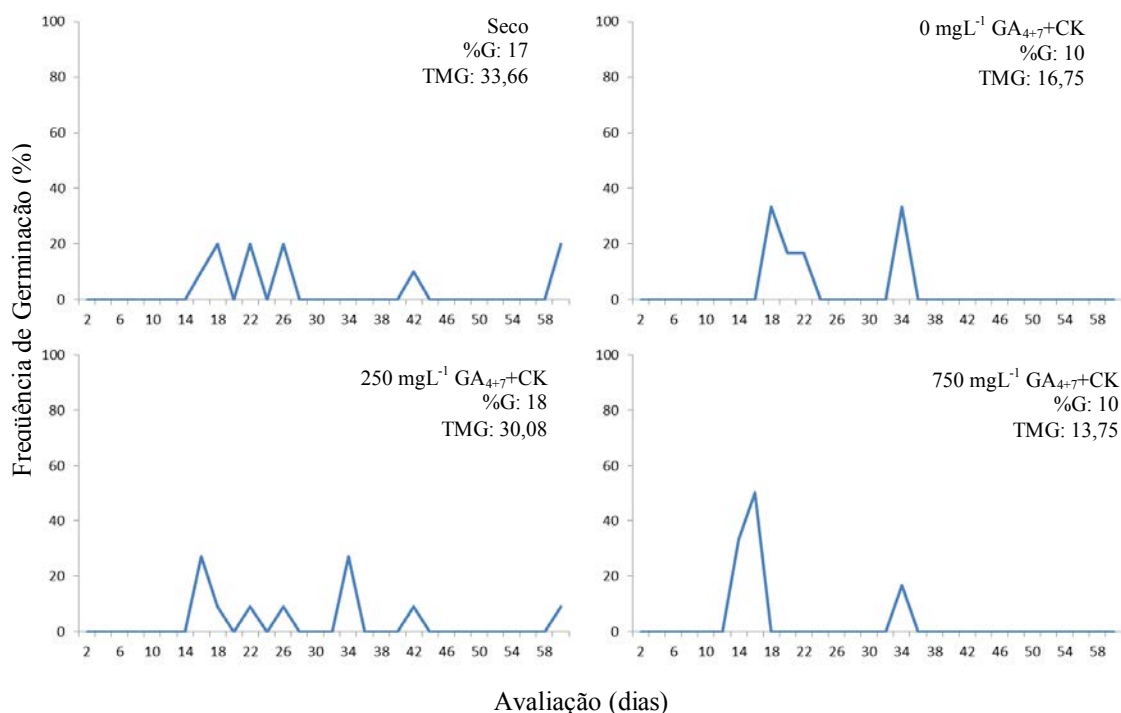
**Figura 12:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 133 DAF com 39% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.



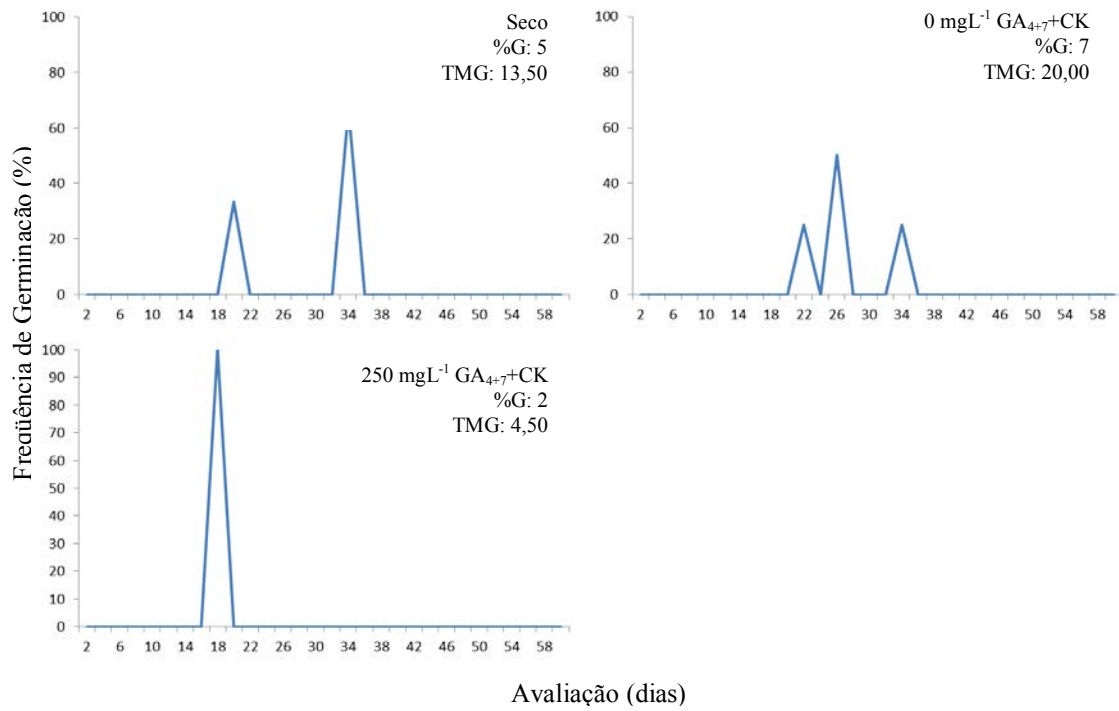
**Figura 13:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 133 DAF com 20% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.



**Figura 14:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 133 DAF com 15% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.



**Figura 15:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 133 DAF com 10% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.



**Figura 16:** Frequência relativa de germinação das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer) 133 DAF com 5% de água embebidas em diferentes concentrações de GA<sub>4+7</sub>+CK. Ciclo 2011/2012.

**Tabela 9:** Conteúdo de proteína total (mg/g massa seca), atividade da enzima peroxidase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína), superóxido dismutase [SOD ( $\text{U mg}^{-1}$ )], teores de lipoperóxido [MDA ( $\text{nmol g}^{-1}$ )] das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldt. H. Rainer) aos 133 DAF submetidas à diferentes níveis de secagem e embebição em diferentes concentrações de  $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$ .

	SEP	0 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	250 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$	750 $\text{mgL}^{-1}$ $\text{GA}_{4+7}+\text{CK}$
<b>Proteína Solúvel Total (<math>\text{mg g}^{-1}</math> MS)</b>				
39%	2,977	2,938	3,087	3,207
20%	2,719	2,531	2,568	2,535
15%	2,739	2,621	2,821	2,859
10%	2,769	2,691	2,813	2,661
5%	2,559	2,468	2,505	2,486
C.V (%)				
<b>POD (<math>\mu\text{mol}\cdot\text{min mg}^{-1}</math>)</b>				
39%	0,410	0,371	0,423	0,334
20%	0,354	0,477	0,421	0,405
15%	0,318	0,381	0,246	0,323
10%	0,399	0,292	0,360	0,283
5%	0,386	0,319	0,274	0,311
C.V (%)				
<b>SOD (<math>\text{U mg}^{-1}</math>)</b>				
39%	50,669	47,438	51,549	31,395
20%	38,691	30,524	42,921	33,849
15%	41,892	43,812	37,533	39,253
10%	41,088	41,781	41,279	39,693
5%	37,571	26,931	38,327	38,863
C.V (%)				
<b>MDA (<math>\text{nmol g}^{-1}</math>)</b>				
39%	16,216	13,689	19,743	20,533
20%	15,819	15,363	15,040	14,395
15%	15,484	13,966	12,941	13,055
10%	15,909	14,194	18,465	21,133
5%	15,836	15,476	15,032	14,395
C.V (%)				

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

**Tabela 10:** Perfil hormonal das sementes ( $\text{ng g}^{-1}$  MS) das sementes de araticum-de-terra-fria (*Annona emarginata* (Schldt. H. Rainer) aos 49, 91, 116 e 133 DAF submetidas à diferentes níveis de secagem.

	GA <sub>4</sub>	ABA	GA <sub>3</sub>	IAA	Trans-zeatina	6BA
49 DAF						
86%	2,949	0,714	6,240	0,715	0,332	14,646
20%	0,704	0,064	8,219	0,000	0,000	0,2450
15%	7,366	0,000	0,772	1,220	0,000	6,700
10%	0,130	0,171	3,394	0,100	0,000	0,266
5%	0,458	0,107	2,013	0,000	0,000	3,220
91 DAF						
56%	0,000	0,255	6,508	0,000	0,212	0,184393
20%	0,000	0,097	1,306	0,000	0,099	0,834261
15%	0,000	0,099	1,538	1,115	0,118	0,107593
10%	0,000	0,054	0,724	0,000	0,058	0,044889
5%	0,000	0,097	1,791	0,000	0,129	0,025235
116 DAF						
43%	0,000	0,198	0,217	0,000	0,013935	3,169323
20%	0,013	0,197	0,553	0,000	0,000	1,295787
15%	1,410	0,286	0,483	0,074837	0,000	999,3117
10%	0,000	0,197	0,163	0,000	0,000	3,112108
5%	0,204	0,273	0,284	0,000	0,008962	5,404228
133 DAF						
39%	0,070	0,315	4,448	0,000	0,026163	1,383074
20%	0,048	0,212	3,039	0,000	0,013113	0,848135
15%	0,000	0,191	3,294	0,000	0,000	0,210834
10%	0,000	0,164	2,825	0,000	0,009798	0,273278
5%	0,000	0,119	1,932	0,000	0,000	0,278678



**Experimento 2: Armazenamento de sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. à baixa temperatura (-5°C). Ciclo 2011/2012.**

**Tabela 11:** Germinação (%) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF submetidas ao armazenamento à -5°C por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
91 DAF				
56%	23	0	0	0
20%	37	10	0	0
15%	28	15	0	0
10%	28	2	0	0
5%	22	2	0	0
116 DAF				
43%	92	5	0	0
20%	73	12	0	0
15%	62	0	0	0
10%	83	0	0	0
5%	58	17	0	0
133 DAF				
39%	23	0	0	0
20%	27	0	0	0
15%	27	0	0	0
10%	17	0	0	0
5%	5	0	0	0

**Tabela 12:** Perfil Hormonal ( $\text{ng g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 91 DAF com conteúdo de água de 59, 10 e 5% após 0, 60, 120 e 180 dias de armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$ .

	56	10	5
	GA <sub>4</sub>		
0	0,00	0,00	0,00
60	0,00	0,00	0,00
120	0,00	0,00	0,00
180	0,00	0,00	0,00
C.V(%)			
	ABA		
0	0,255	0,054	0,097
60	0,311	0,076	0,072
120	0,176	0,093	0,093
180	0,180	0,089	0,078
C.V(%)			
	IAA		
0	0,00	0,00	0,00
60	8,890	1,050	0,760
120	3,690	0,146	1,730
180	2,370	1,000	5,080
C.V(%)			
	Trans-zeatina		
0	0,212	0,058	0,129
60	0,121	0,053	0,026
120	0,082	0,055	0,082
180	0,093	0,080	0,072
C.V(%)			
	6-BA		
0	0,184	0,004	0,025
60	0,065	0,000	0,013
120	0,000	0,000	0,009
180	0,064	0,000	0,000
C.V(%)			
	GA <sub>3</sub>		
0	0,508	0,724	1,791
60	0,000	0,000	0,000
120	0,000	0,000	0,000
180	0,000	0,000	0,000
C.V(%)			

**Tabela 13:** Perfil Hormonal ( $\text{ng g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 116 DAF com conteúdo de água de 35, 10 e 5% após 0, 60, 120 e 180 dias de armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$ .

	43	10	5
	GA <sub>4</sub>		
0	0,000	0,000	0,204
60	0,000	0,263	0,000
120	0,000	0,000	0,035
180	0,000	0,000	0,000
C.V(%)			
	ABA		
0	0,198	0,197	0,273
60	0,249	0,197	0,092
120	0,149	0,097	0,270
180	0,121	0,098	0,146
C.V(%)			
	IAA		
0	0,000	0,000	0,000
60	2,729	0,135	3,268
120	1017	7,309	0,907
180	7,2923	2,105	1,003
C.V(%)			
	Trans-zeatina		
0	0,013	0,000	0,008
60	0,109	0,022	0,000
120	0,000	0,008	0,000
180	0,000	0,008	0,000
C.V(%)			
	6-BA		
0	3,169	3,112	5,404
60	0,124	2,924	0,000
120	0,000	0,000	1,407
180	0,104	0,068	0,237
C.V(%)			
	GA <sub>3</sub>		
0	0,217	0,163	0,284
60	0,000	0,063	0,000
120	0,000	0,000	0,000
180	0,000	0,000	0,000
C.V(%)			

**Tabela 14:** Perfil Hormonal ( $\text{ng g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schltdl.) H. Rainer aos 133 DAF com conteúdo de água de 35, 10 e 5% após 0, 60, 120 e 180 dias de armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$ .

	39	10	5
	GA <sub>4</sub>		
0	0,070	0,000	0,000
60	0,087	0,000	0,000
120	0,000	0,000	0,000
180	0,113	0,000	0,000
C.V(%)			
	ABA		
0	0,315	0,164	0,119
60	0,628	0,117	0,180
120	0,287	0,132	0,107
180	0,223	0,117	0,209
C.V(%)			
	IAA		
0	0,000	0,000	0,000
60	0,729	5,239	2,138
120	4,039	2,711	1,639
180	1,151	3,157	2,752
C.V(%)			
	Trans-zeatina		
0	0,026	0,009	0,000
60	0,000	0,000	0,000
120	0,000	0,010	0,000
180	0,024	0,000	0,000
C.V(%)			
	6-BA		
0	1,383	0,273	0,278
60	1,515	0,000	0,089
120	0,103	0,000	0,043
180	2,004	0,000	0,000
C.V(%)			
	GA <sub>3</sub>		
0	4,448	2,825	1,932
60	0,000	0,000	0,000
120	0,000	0,000	0,000
180	0,000	0,000	0,000
C.V(%)			

**Tabela 15:** Conteúdo de proteínas solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF submetidas ao armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$  por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
91 DAF				
56%	5,473	219,115	274,342	216,341
20%	1,724	118,030	104,854	120,091
15%	1,967	130,192	144,548	102,744
10%	1,863	112,690	119,632	123,898
5%	2,101	120,858	118,458	101,045
C.V (%)				
116 DAF				
43%	3,512	135,212	169,045	135,712
20%	2,587	123,898	126,963	123,630
15%	2,480	86,646	92,938	192,938
10%	2,151	102,744	109,036	118,036
5%	2,016	93,098	93,872	160,539
C.V (%)				
133 DAF				
39%	2,968	121,574	107,685	107,187
20%	2,688	98,439	86,734	77,051
15%	2,751	107,049	104,955	94,097
10%	2,805	102,301	101,859	87,838
5%	2,570	100,818	92,475	104,714
C.V (%)				

**Tabela 16:** Atividade da peroxidase [POD ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína)] das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF submetidas ao armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$  por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
91 DAF				
56%	0,598	2,372	1,275	1,759
20%	1,565	2,459	2,456	2,672
15%	0,265	3,347	1,436	1,592
10%	0,318	1,223	1,015	1,682
5%	0,519	0,727	1,241	1,317
C.V (%)				
116 DAF				
43%	0,772	1,263	0,902	1,625
20%	0,541	1,499	1,105	0,825
15%	0,318	1,447	0,825	1,570
10%	0,536	1,340	0,600	0,798
5%	0,423	1,158	0,830	0,643
C.V (%)				
133 DAF				
39%	0,387	0,831	0,701	0,717
20%	0,336	0,543	0,690	0,936
15%	0,324	0,464	0,616	1,083
10%	0,404	0,881	0,710	1,234
5%	0,352	0,664	1,276	1,058
C.V (%)				

**Tabela 17:** Atividade da superóxido dismutase [SOD ( $\text{U mg}^{-1}$  proteína)] das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF submetidas ao armazenamento à  $-5^{\circ}\text{C}$  por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
	91 DAF			
56%	6,459	75,730	49,074	61,561
20%	23,430	66,867	58,737	67,013
15%	7,065	52,155	49,436	52,669
10%	4,317	65,439	53,275	53,098
5%	10,821	50,536	38,954	56,729
C.V (%)				
	91 DAF			
43%	53,774	55,633	35,297	61,561
20%	55,729	58,571	40,326	46,545
15%	53,442	91,901	59,587	55,954
10%	57,270	31,559	35,553	58,894
5%	33,671	57,951	61,414	60,107
C.V (%)				
	91 DAF			
39%	50,744	66,956	58,572	50,732
20%	38,678	46,545	44,905	46,203
15%	39,478	47,139	58,852	55,249
10%	41,191	58,894	57,391	62,241
5%	37,459	62,621	61,703	57,476
C.V (%)				

**Tabela 18:** Teores de lipoperóxido (nmol MDA g<sup>-1</sup> MS) das sementes de *Annona emarginata* (Schldtl.) H. Rainer aos 91, 116 e 133 DAF submetidas ao armazenamento à -5°C por 0, 60, 120 e 180 dias.

	0	60	120	180
91 DAF				
56%	20,163	89,017	72,318	45,083
20%	10,924	35,416	26,376	24,344
15%	7,287	25,600	32,091	20,625
10%	6,499	19,625	17,020	12,795
5%	9,825	9,274	9,594	12,477
C.V (%)				
116 DAF				
43%	14,826	10,811	12,468	12,267
20%	3,732	10,560	10,698	8,733
15%	8,653	8,400	8,864	6,270
10%	9,701	4,954	5,394	5,291
5%	2,535	4,624	5,225	6,892
C.V (%)				
133 DAF				
39%	16,216	5,512	5,673	5,025
20%	16,278	5,413	4,861	6,288
15%	15,737	5,435	6,100	6,479
10%	15,909	5,749	5,412	6,696
5%	16,302	2,101	2,326	2,180
C.V (%)				